

167

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-530068  
(P2002-530068A)

(43) 公表日 平成14年9月17日 (2002.9.17)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 5/06		A 6 1 K 35/30	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/30		C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		15/00	A 4 C 0 8 7
15/09			B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 87 頁)

(21) 出願番号 特願2000-582534(P2000-582534)  
(86) (22) 出願日 平成11年11月18日 (1999.11.18)  
(85) 翻訳文提出日 平成13年5月18日 (2001.5.18)  
(86) 国際出願番号 PCT/US 99/27613  
(87) 国際公開番号 WO 00/29550  
(87) 国際公開日 平成12年5月25日 (2000.5.25)  
(31) 優先権主張番号 09/195, 569  
(32) 優先日 平成10年11月18日 (1998.11.18)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 09/425, 462  
(32) 優先日 平成11年10月22日 (1999.10.22)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 カリフォルニア・インスティテュート・オブ・テクノロジー  
CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
アメリカ合衆国91125カリフォルニア州パサディナ、イースト・カリフォルニア・ブールバード1200番  
(71) 出願人 アメリカ合衆国  
アメリカ合衆国、メリーランド 20852、  
ロックビル、スイート 325、エグゼキューティブ プルバード 6011  
(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経系前駆細胞の低酸素培養

(57) 【要約】

本発明は、細胞の生存、増殖、及び/又は細胞の分化を促進させる条件下での培養内細胞の育成に関する。本発明者らは、細胞培養法に従来用いられている環境酸素条件に比べて細胞を低酸素中で増殖した場合に増殖を促進させアポトーシスを減少させることを見出した。更に、本発明者らは、特定の運命への前駆細胞の分化が低酸素中で促進され、中脳前駆体を低酸素条件でエクспанジョン及び分化させたときに非常に多くの数と割合のドーパミン作動性ニューロンが得られることを見出した。即ち、より生理的な酸素レベルでCNS前駆体の増殖及び分化が促進され、低酸素は特定のニューロンタイプのex vivo 生成を有効に補助する。これらの知見を利用する方法及び組成物が記載されている。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 未分化の中枢神経系(CNS)細胞を低酸素環境条件下で培養することを含む、細胞の分化を増大させる方法であって、前記低酸素環境条件は前記神経細胞の細胞分化を促進するものである前記方法。

【請求項2】 低酸素環境条件が約0.25%～約18%酸素の環境酸素条件を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 低酸素環境条件が約0.5%～約15%酸素の環境酸素条件を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 低酸素環境条件が約1%～約10%酸素の環境酸素条件を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 低酸素環境条件が約1.5%～約6%酸素の環境酸素条件を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 低酸素環境条件がCNS細胞にとっての生理学的酸素条件を模倣するものである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 細胞が初代組織培養細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 細胞が細胞株由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 細胞が、中枢神経系幹細胞、脊髄由来前駆細胞、グリア細胞、星状細胞、神経幹細胞、中枢神経系神経冠由来細胞、神経前駆細胞、神経細胞、肝細胞、および骨髓由来細胞からなる群より選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 細胞が胎児細胞である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 細胞が成体細胞である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 細胞が、中脳前駆細胞、側方神経節前駆細胞、皮質前駆細胞、星状細胞および神経芽細胞からなる群より選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 分化が細胞の分化特異的表現型を監視することによって決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 分化特異的表現型が、メッセージレベル、タンパク質レベル、細胞下局在性、機能アッセイまたは形態変化を監視することによって決定さ

れる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 メッセージレベルが、PCR™、in situハイブリダイゼーション、RNase保護アッセイ、または単一細胞PCR™を用いて監視される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 タンパク質レベルが抗体染色、HPLC、ウエスタンブロットまたは免疫沈降によって監視される、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 監視されるメッセージレベルが、ネスチン、チロシンヒドロキシラーゼ、GAPDH；BDNF；GDNF；FGFR3；En1；FGF8；SHH、Ptx3；Nurr1；VEGF；EPO；HIF1 $\alpha$ またはVHLに対するメッセージである、請求項14に記載の方法。

【請求項18】 監視されるタンパク質レベルが、ネスチン、チロシンヒドロキシラーゼ、ドーパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼまたはドーパミン輸送因子のレベルである、請求項15に記載の方法。

【請求項19】 機能解析がドーパミン産生速度を監視するものである、請求項14に記載の方法。

【請求項20】 低酸素条件が、20%酸素インキュベーター条件で育成した類似の細胞集団に比較して、ドーパミン作動性神経細胞が濃縮された細胞集団を産生する、請求項1に記載の方法。

【請求項21】 低酸素条件が、20%酸素インキュベーター条件で育成した類似の細胞集団に比較して、セロトニン作動性神経細胞が濃縮された細胞集団を産生する、請求項1に記載の方法。

【請求項22】 低酸素条件が、20%酸素インキュベーター条件で育成した類似の細胞集団に比較して、GABA作動性神経細胞が濃縮された細胞集団を産生する、請求項1に記載の方法。

【請求項23】 低酸素条件が、20%酸素インキュベーター条件で育成した類似の細胞集団に比較して、グルタミン酸作動性神経細胞が濃縮された細胞集団を産生する、請求項1に記載の方法。

【請求項24】 神経細胞成長刺激剤、有糸分裂促進剤、サイトカイン、神経細胞保護因子または抗-アポトーシス剤の存在下で細胞を育成する、請求項1

に記載の方法。

【請求項25】 分化した表現型が細胞を低酸素環境条件から20%酸素培養条件に移した後も維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項26】 20%酸素培養条件に移す前に、細胞が低酸素環境条件下で複数世代増殖される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 細胞が低酸素環境条件下で連続的に維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項28】 細胞を低酸素環境条件で培養することを含む、培養中のCNS細胞のアポトーシスを阻害する方法。

【請求項29】 低酸素環境条件が、約0.25%～約18%酸素の環境酸素条件を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 細胞を低酸素環境下で培養することを含む培養物中のCNS細胞の拡張を増加させる方法であって、前記細胞が20%酸素インキュベーター条件で育成した前記細胞に比較して増大した拡張を示す、前記方法。

【請求項31】 低酸素環境条件が、約0.25%～約18%酸素の環境酸素条件を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 低酸素環境条件がCNS細胞にとっての生理学的酸素条件を模倣するものである、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 細胞が初代組織培養細胞である、請求項30に記載の方法。

【請求項34】 細胞が細胞株由来である、請求項30に記載の方法。

【請求項35】 細胞が胎児細胞である、請求項30に記載の方法。

【請求項36】 細胞が成体細胞である、請求項30に記載の方法。

【請求項37】 CNS細胞を低酸素環境下で培養することを含む、培養物中のCNS細胞の増殖を増加させる方法であって、前記低酸素環境下の培養が、20%酸素インキュベーター条件で育成する場合に比較して細胞増殖を増加させる、前記方法。

【請求項38】 神経変性疾病に対して使用する細胞を調製する方法であって、



- a) CNS細胞の集団を得ること、および
- b) 前記細胞を低酸素環境条件で育成することであって、前記低酸素環境条件が前記神経変性疾病に關与する遺伝子の発現を増大させるものであること、を含む、前記方法。

【請求項39】 神経変性疾病がパーキンソン病である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 遺伝子がチロシンヒドロキシラーゼ(TH)である、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 細胞が初代細胞である、請求項38に記載の方法。

【請求項42】 細胞が細胞株由来である、請求項38に記載の方法。

【請求項43】 更に、細胞をドーパミン生合成タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で接触させることを含み、前記ポリヌクレオチドが前記細胞中で活性なプロモーターの転写制御下にある、請求項38に記載の方法。

【請求項44】 更に、細胞をドーパミン放出タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で接触させることを含み、前記ポリヌクレオチドが前記細胞中で活性なプロモーターの転写制御下にある、請求項38に記載の方法。

【請求項45】 更に、細胞をドーパミン放出タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で接触させることを含み、前記ポリヌクレオチドが前記細胞中で活性なプロモーターの転写制御下にある、請求項43に記載の方法。

【請求項46】 更に、細胞を、ドーパミン生合成タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で接触させることを含み、前記ポリヌクレオチドが前記細胞中で活性なプロモーターの転写制御下にある、請求項44に記載の方法。

【請求項47】 ドーパミン生合成タンパク質がTH；L-アミノ酸デカルボキシラーゼ(AADC)およびエリスロポイエチンからなる群より選ばれる、請求項43に記載の方法。

【請求項48】 ドーパミン放出タンパク質が小胞モノアミン輸送因子(VMAT)である、請求項44に記載の方法。

【請求項49】 第1および第2のポリヌクレオチドが異なるプロモーターの制御下にある、請求項45に記載の方法。

【請求項50】 第1および第2のポリヌクレオチドが異なるプロモーターの制御下にある、請求項46に記載の方法。

【請求項51】 プロモーターが、CMV IE、SV40 IE、 $\beta$ -アクチン、THプロモーター、AADCプロモーター、およびネスチンプロモーターからなる群より選ばれる、請求項43に記載の方法。

【請求項52】 第1および第2のポリヌクレオチドは各々ポリアデニル化シグナルに共有結合している、請求項45に記載の方法。

【請求項53】 第1および第2のポリヌクレオチドは各々ポリアデニル化シグナルに結合している、請求項46に記載の方法。

【請求項54】 出発CNS細胞を得ること、および前記細胞を低酸素環境条件下で育成することを含み、前記条件が分化神経細胞を生成するものである方法によって作製された細胞。

【請求項55】 出発細胞がネスチン-陽性細胞である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 低酸素環境条件がネスチン-陰性細胞を作り出す、請求項54に記載の方法。

【請求項57】 低酸素環境条件がTH陽性細胞を作り出す、請求項54に記載の方法。

【請求項58】 細胞が、更に、外来性遺伝子をコードし、プロモーターに機能的に結合したポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項59】 患者のパーキンソン病を治療する方法であって、  
a) 患者に移植するために適切な細胞を得ること、  
b) 前記細胞を低酸素環境条件下で育成すること、および、  
c) 工程b) で育成した前記細胞を前記患者に移植すること、

を含み、前記移植細胞は20%酸素インキュベーター条件で育成した類似の細胞に比べて、前記患者においてドーパミン産生能が増加している、前記方法。

【請求項60】 細胞が患者からのものであり、ドーパミン産生を増加させるタンパク質を発現するポリヌクレオチドでトランスダクションされたものである、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 細胞が患者と異なる供給源からのCNS細胞である、請求項59に記載の方法。

【請求項62】 細胞が、ドーパミン産生を増加させるタンパク質を発現するポリヌクレオチドでトランスダクションされている、請求項59に記載の方法

。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 関連出願

本出願は、1998年11月18日付米国特許出願番号09/195,569号一部継続出願である。上記出願の文章全体は本明細書に引用に含まれるものとする。

## 【0002】

アメリカ合衆国政府は、本発明／アメリカ予防衛生研究所提供グラントNo. AR40780-8およびAR42671-05並びにDARPA/AFOSRグラントNo. F49620-98-10487の条項に従う発明において権利を有するであろう。

## 【0003】

## (発明の分野)

本発明は培養における細胞の育成に関する。より具体的には、本発明は、低酸素環境条件で細胞を育成させることによって、細胞の生存、細胞の増殖および／または固有の経路による細胞の分化を高める方法および組成物に関する。

## 【0004】

## (発明の背景)

ドナー器官が決定的に不足する時代に、細胞移植を臨床領域に適用しようとする試みは差し迫った要請である (Neelakanta & Csete, 1996)。実際、細胞移植および組織移植は、嚢胞性線維症 (肺)、腎不全、退行性心疾患および神経変性疾患を含む多様な疾患の治療的措置のための望ましい技術として今や十分に認知されている。しかしながら、この技術は、好ましくかつ非常に要請の高い措置ではあるが、この種の治療措置の主要な障害は、生命活性を有する分化した細胞の利用可能な供給源の不足である。一般に分化した細胞は容易に培養でエクспанジョン (expand) させることができない。したがって、生命活性を有する分化細胞の数および／または入手可能性を高める方法が要求される。

## 【0005】

中枢神経系 (CNS) (脳および脊髄) は極めて再生能力が低く、このことは多数の神経変性疾患 (例えばパーキンソン病) で実証されている。そのような疾患は薬理学的措置 (パーキンソン病の場合はL-ドーパ) を用いてある程度制御で

きるが、神経病理学的損傷および消耗性進行を元に戻すことはできない。細胞移植は、そのような損傷の結果を単に治療するものとは反対に、神経病理学的損傷を回復させるための有望な選択肢を提供する。

#### 【0006】

培養CNS幹細胞は自己再生が可能で、ミトジェンを除いた後、稀突起神経膠細胞、星状神経膠細胞およびニューロンを予測可能な割合で再生させる固有の能力を有する (Johe et al., 1996)。この固有の分化能の培養時操作は、特定の分化現象を維持したり、増幅させたりまたは減少させたりする複雑な因子群を特定するために用いられた。そのような実験のほとんどは、局所的および遠隔的に作用する成長因子および栄養性因子だけでなくCNS系列を規定する転写因子の主要な役割を力説している (Johe et al., 1996, Panchinsion et al., 1998)。ドーパミン作動性ニューロンおよびこれらの培養に由来する前駆細胞は、パーキンソン病患者の細胞置換治療の有望な供給源として特に興味深い (概説: Olanow et al., 1996)。

#### 【0007】

理想的には、ex vivo培養条件は完全に忠実にin vivoの細胞環境を再現すべきである。この考えは外移植片を用いて発生を研究する場合に特に妥当である。なぜならば、細胞の発育の選択および分化のための条件を特定できるからである。CNS幹細胞の場合、特に生存、増殖およびドーパミン作動性ニューロンに至る細胞を最大にすることがその後の細胞移植治療に必須である。したがって、そのような細胞の分化を理解し制御することは、移植または多様な条件に対するin vivoでのCNS細胞の反応の研究で用いることができる、生命活性を有する有用な生成物を提供するために重要である。

#### 【0008】

胚の発生の場合、各組織および器官は巧みに組織化された発生によって成長する。その場合、比較的特殊化されていないまたは”未分化”の前駆細胞または幹細胞が、最終的に特殊な分化した特性および機能をもつ子孫を生じる。成熟組織および器官は多くのタイプの分化細胞を含み、各細胞タイプは特定の遺伝子サブセットを発現させる。この遺伝子サブセットは、細胞の固有の構造、特異的機能

並びに、環境シグナルおよび栄養素と相互反応し応答する能力を順次特定していく。これらの分子的、構造的および機能的な能力および特性が細胞の表現型を構成する。同様に、損傷または変性成人組織が修復および再生を受ける場合、局所の $O_2$ 供給に変化が存在するとき、連携された細胞増殖および／または分化が惹起される。酸素レベルは、正常な血液供給が外傷または塞栓症的事例（心筋梗塞、卒中など）によって減少または一過性に停止するような多くの再生例で特にいえることである。

#### 【0009】

したがって、臨床時条件設定では、ガスは器官の生存で主要な変数として十分に認識され、酸素はもっとも重要なガスパラメーターである。実質的に全ての近代的細胞培養は、5% $CO_2$ および95%空気を含むガス雰囲気中で37℃で実施される。このような条件は人体中心部の温度および生理的 $CO_2$ 濃度にほぼ完全に適合する。例えば、脳組織の平均 $CO_2$ は8kPa (60mmHg) または7%である (Hoffman et al., 1998)。しかしながら、注目すべきことには、標準的組織培養の酸素は生理的組織レベルを反映せず、実際のところ明らかに酸素過剰である。

#### 【0010】

平均海面では、（湿り気を付与されていない）部屋の空気は21%の $O_2$ を含み、これは21.3kPa (160mmHg) の酸素分圧 [0.21(101.3kPa (760mmHg))] に換算される。しかしながら、身体の平均酸素レベルはこのレベルよりはるかに低い。肺胞空気は14%の酸素を含み、動脈の酸素濃度は12%で、静脈の酸素レベルは5.3%で、組織細胞内の平均酸素濃度はわずかに3%である (Guyton, and Hall, 1996)。さらにまた、微小電極による組織酸素の直接測定によって、脳の部分は全身の平均組織レベルよりも顕著に低い酸素レベルに通常曝されており、脳の高い酸素利用を反映していることが明らかにされた。これらの研究は、毛細管密度の局所的相違に起因する脳の平均酸素レベルにおける顕著な局部的変動（表1）を明らかにした。成人における脳の平均組織酸素濃度は1.5%で (Silver & Erecinska, 1988)、ヒツジ胎児の平均酸素張度もまた1.6%と見積もられた (Koos & Power, 1987)。

#### 【0011】



## 【表1】

表1：微小電極で測定したラット脳組織の局部酸素分圧

脳領域	%O <sub>2</sub>
髄質（灰質）	2.5-5.3
髄質（白質）	0.8-2.1
視床下部	1.4-2.1
海馬	2.6-3.9
脳橋、脳弓	0.1-0.4

（以下の文献から引用：L. Silver, M. Erecinska, "Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells.", In Oxygen Transport to Tissue XX, 7-15, edited by Hudetz & Bruley, Plenum Press, New York(1988)）

## 【0012】

したがって上記の考察から、標準的培養条件下では周囲酸素レベルは明らかに酸素過剰で、完全に生理的範囲内ではない。このような細胞育成条件は、脳または他の身体領域に移植する細胞および組織を生成するため、またはin vivoで発生している事象の正確なin vitroモデルを提供するためには不適切である。したがって、治療目的および研究目的で利用できる分化細胞を製造する方法がなお必要である。本発明は、そのような方法を提供することを目的とする。

## 【0013】

本発明は、より忠実に生理的酸素状態を模倣するために低酸素環境条件で細胞を育成することを目的とする。そのような状態で細胞を育成することによってある驚くべきかつ予期せぬ結果が得られた。これらの結果を利用し、本明細書でさらに詳細に開示する。より具体的には、本発明は、細胞の生存度、細胞の増殖および／または固有の経路による細胞の分化を高めるためにそれぞれ別個に有用な方法を開示する。

## 【0014】

ある実施態様では、本発明は、未分化の中樞神経系（CNS）細胞を低酸素環境

条件で培養することを含む細胞分化を高める方法を開示する。この場合、低酸素環境条件は神経細胞の細胞分化を促進する。低酸素環境条件の定義は本明細書の他の場所で極めて詳しく説明する。しかしながら、ある実施態様では、低酸素環境条件は約0.25%から約18%酸素の周囲酸素条件を含む。他の実施態様では、周囲酸素条件は、約0.5%から約15%酸素の周囲酸素条件を含む。さらに他の実施態様では、低酸素環境条件は、約1%から約10%酸素の周囲酸素条件を含む。さらに他の実施態様では、低酸素環境条件は、約1.5%から約6%酸素の周囲酸素条件を含む。もちろんのこと、これらは培養で使用可能な周囲酸素条件の代表的範囲であって、一般にこのような範囲のいずれかに含まれるか、またはCNS細胞の生理的酸素状態に類似するこれらの範囲のいずれの酸素状態も当業者は利用することができることは理解されるところである。したがって当業者は、酸素培養条件を0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、10%、10.5%、11%、11.5%、12%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%、15.5%、16%、16.5%、17%、17.5%、18%、18.5%に設定するか、またはこれらのいずれかの数字の間の任意の他の酸素条件に設定することができるであろう。

#### 【0015】

開示される方法で用いられる細胞はCNS研究のために日常的に用いられるいずれの細胞でもよい。したがって、細胞は初代組織培養細胞でも細胞株に由来するものでもよい。細胞は胎児細胞でも成人の細胞でもよい。個々の実施態様では、細胞は、中枢神経系幹細胞、脊髄由来前駆細胞、神経膠細胞、星状神経膠細胞、ニューロン幹細胞、中枢神経系神経冠由来細胞、ニューロン前駆細胞、ニューロン細胞、肝細胞、および骨髄由来細胞から成る群から選択できるであろう。好ましい実施態様では、外側神経節前駆細胞、皮質前駆細胞、星状神経膠細胞または神経芽細胞であろう。

本方法は、分化の量、レベルまたは程度を決定することを含むであろう。当業者は、細胞の分化を測定するために用いられる技術に精通しているであろう。分化は、分化に固有の表現型を細胞でモニターすることによって測定できる。例えば、分化固有表現型は、メッセージレベル、タンパク質レベル、細胞内分布、機

能アッセイ、または形態変化をモニターすることによって測定できる。

【0016】

メッセージレベルの測定に用いることができる技術には種々の技術があり、PCR（登録商標）、*in situ*ハイブリダイゼーション、RNA分解酵素保護アッセイ、または単一細胞PCR（登録商標）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。個々の実施態様では、本発明は、ネスチン、チロシンヒドロキシラーゼ、GAPDH;BDNF;GDNF;FGFR3;En1;FGF8;SHH;Pt3;NuRR1;VEGF;EP0;HIF1 $\alpha$ またはVHLのメッセージレベルをモニターできる。もちろんのこと、これらはCNS細胞のための代表的分化マーカーまたは酸素に対する細胞反応マーカーであり、当業者は、煩雑な実験を実施することなく本明細書に特に記載したマーカーに代わって別の同様なマーカーを代用することができる。他の実施態様では、タンパク質レベルが、例えば抗体染色、HPLC、ウェスタンブロッティングまたは免疫沈澱を用いてモニターされる。より具体的な実施態様では、モニターされるタンパク質レベルは、ネスチン、チロシンヒドロキシラーゼ、ドーパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼまたはドーパミントランスポーターのレベルである。機能アッセイは、典型的には選択したCNS細胞の特定の機能をモニターするアッセイであろう。特に有用な機能アッセイは、ドーパミン産生速度をモニターするものであろう。

【0017】

本発明の好ましい特徴は、20%酸素インキュベーターの条件で育成した同様な細胞集団と比較したとき、低酸素条件ではドーパミン作動性ニューロンが豊富な細胞集団が産生されるということである。別の好ましい実施態様では、20%酸素インキュベーターの条件で育成した同様な細胞集団と比較したとき、低酸素条件はセロトニン作動性ニューロンが豊富な細胞集団を産生する。さらに別の実施態様では、20%酸素インキュベーターの条件で育成した同様な細胞集団と比較したとき、低酸素条件はGABA作動性ニューロンが極めて少ない細胞集団を産生する。さらにまた、本発明のある方法では、低酸素条件は、20%酸素インキュベーターの条件で育成した同様な細胞集団と比較したとき、グルタミン酸作動性ニューロンが極めて少ない細胞集団を産生する。

【0018】

好ましい実施態様では、本方法は、ニューロン増殖刺激物質、マイトジェン、サイトカイン、神経保護因子または抗アポトーシス剤の存在下で細胞を育成することを含む。本発明者らは、20%O<sub>2</sub>に対し低酸素での培養の結果、EPO発現が顕著に増加することを見出した。ある実施態様では、分化表現型は、低酸素環境条件から20%酸素培養状態へ細胞を移した後も維持される。ある実施態様では、細胞は、20%酸素培養状態に移す前に数世代低酸素環境条件で育成することができる。他の実施態様では、細胞は低酸素環境条件で連続して維持することができる。

本発明の別の特徴では、低酸素環境条件で細胞を育成することを含む、培養CNS細胞のアポトーシスを抑制する方法が提供される。

#### 【0019】

さらに別の実施態様では、細胞を低酸素環境条件で育成することを含む培養CNS細胞のエクспанション(expansion)を増強する方法が提供される。この場合、20%酸素インキュベーターの条件で細胞を育成した場合と比較して細胞は低酸素環境条件でエクспанションの強化を示す。

さらに別の実施態様では、本発明はさらに、低酸素環境中でCNS細胞を育成することを含む、培養細胞の増殖を高める方法を提供する。この場合、20%酸素インキュベーターの条件で細胞を育成させた場合と比較して低酸素環境条件での育成は細胞分裂を高める。

さらにまた、CNS細胞集団を得て、それら細胞を低酸素環境条件で育成することを含む、神経変性疾患に対抗して使用される細胞を調製する方法が提供される。この場合、低酸素環境条件は神経変性疾患で重要な遺伝子の発現を高める。ある実施態様では、前記神経変性疾患はパーキンソン病で、前記遺伝子はチロシンヒドロキシラーゼ (TH) である。

#### 【0020】

本方法はさらに、ドーパミン生合成タンパク質をコードする第一のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で細胞と接触させることを含み、この場合、前記ポリヌクレオチドは前記細胞で活性を有するプロモーターの転写制御下にある。さらに、本方法は、ドーパミン放出タンパク質をコードする第

一のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で細胞を接触させることを含み、この場合、前記ポリヌクレオチドは前記細胞で活性を有するプロモーターの転写制御下にある。さらにまた、ドーパミン放出タンパク質をコードする第二のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で細胞と接触させることを含む方法もまた提供され、この場合、前記ポリヌクレオチドは前記細胞で活性を有するプロモーターの転写制御下にある。他の実施態様では、ドーパミン生合成タンパク質をコードする第二のポリヌクレオチドと、前記タンパク質の発現に適した条件下で細胞と接触させることが含まれ、この場合、前記ポリヌクレオチドは前記細胞で活性を有するプロモーターの転写制御下にある。

#### 【0021】

より具体的な実施態様では、ドーパミン生合成タンパク質は、TH；L-アミノ酸デカルボキシラーゼ（AADC）、エリスロポイエチン、またはドーパミン生合成に直接または間接的に関与する任意の他のタンパク質であろう。ドーパミン放出タンパク質は濾胞性モノアミントランスポーター（VMAT）で、これはVMAT1またはVMAT2であろう。ある実施態様では、第一および第二のポリヌクレオチドは異なるプロモーターの制御下にある。前記プロモーターは、使用される細胞で機能を有する、当業者に既知の任意のプロモーターである。例えば、プロモーターは、CMVIE、SV40IE、 $\beta$ -アクトニン、THプロモーター、AADCプロモーターおよびネスチンプロモーターであろう。第一および第二のポリヌクレオチドは各々ポリアデニル化シグナルに共有結合によって連結されているであろう。

#### 【0022】

さらにまた本方法にしたがって製造される細胞も本発明に包含される。本方法は、出発CNS細胞を得て、前記細胞を分化ニューロン細胞を産生する低酸素環境条件で細胞を育成することを含む。ある実施態様では、前記出発細胞はネスチン陽性細胞である。より具体的には、低酸素環境条件は、従来の培養条件よりもより迅速により大量にネスチン陰性分化細胞を産生する。ある実施態様では、低酸素環境条件はTH陽性細胞を産生する。他の実施態様では、細胞はさらに外因性遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含み、この場合前記ポ



リヌクレオチドはプロモーターに機能的に連結されている。

#### 【0023】

本発明の別の特徴では患者のパーキンソン病を治療する方法が提供される。本方法は、前記患者に移植するために適した細胞を入手し、前記細胞を低酸素環境条件で育成し、さらに低酸素環境条件で育成した細胞を前記患者に移植することを含み、この場合、20%酸素インキュベーターの状態で作成させた同様な細胞と比較したとき、移植細胞は患者でのドーパミン産生能力が増強されている。ある実施態様では、細胞は、前記患者から得られ、ドーパミン産生を増加させるタンパク質を発現するポリヌクレオチドで形質導入され、低酸素環境条件で処理またはエクспанジョンされる。他の好ましい実施態様では、細胞は患者以外の供給源に由来するCNS細胞である。好ましい実施態様では、細胞は、ドーパミン産生を増加させるタンパク質を発現するポリヌクレオチドで形質転換され、低酸素条件で処理またはエクспанジョンされる。

#### 【0024】

本発明の他の目的、特色および利点は以下の詳細な説明によって明らかとなる。しかしながら、詳細な説明および個々の実施例は本発明の好ましい実施態様を示すが、当業者には本発明の範囲内で多様な変更および改変が本詳細な説明に基づいて可能であるのでそれらは単に説明として提示される。

#### 【0025】

細胞移植療法が広くかつ一般的に用いられるようになるためには、適切に分化した生命活性を有する細胞が入手できることが必要である。好ましくは、これらの細胞は、凍結保存しても表現型の完全性が低下しない十分な復元力を有する必要がある。細胞を周囲大気O<sub>2</sub>レベル（以下では従来のO<sub>2</sub>状態または20%O<sub>2</sub>培養状態と呼ぶ）で育成させる高インキュベーター酸素レベルはそのような細胞の産生を促進しない。これらの細胞はしばしば、役に立つほど十分な数では生存せず増殖せずまたは分化しない。従来の培養でこれらの細胞を増殖させた場合、移植での使用はいうまでもなく、最良の場合でもin vitroのモデルアッセイ実験にも不適切な細胞しか得られない。

#### 【0026】



本発明は、分化し生命活性を有し凍結保存に耐える細胞を製造するための方法および組成物を提供することを目的とし、さらに、*in vivo*での条件設定でそのような細胞がどのような生化学的動態を有するかについての正確な指標を提供する。したがって、本方法は、性状決定実験を実施するために*in vitro*で用いるか、または疾患、外傷による損傷、虚血または薬剤誘発損傷によって障害された細胞のための置換治療として*in vivo*で用いることができる細胞を提供するであろう。さらに、本方法は、移植にも用いることができる未分化の前駆細胞の生存の強化をもたらすことは特記されるべきである（これら未分化の細胞は適切な環境状態に置かれたとき適切な分化経路をたどるであろう）。

#### 【0027】

本発明は特に、大気より低い／生理的酸素レベルの培養条件を用いてニューロン細胞集団を培養しこれを濃縮することを含む。この細胞集団は、特定のニューロン表現型を発現させるためにエクспанションおよび／または分化させた細胞を含む。細胞分化の増加とは、原始的な未分化状態から特定の細胞表現型（ドーパミン作動性表現型；GABA作動性表現型；セロトニン作動性表現型など）が発現されている細胞へと細胞プロセスが変換されるようなものである。特に、低O<sub>2</sub>状態での成育はドーパミン作動性およびセロチン作動性ニューロン集団の濃縮をもたらし、一方、GABA作動性およびグルタミン酸作動性ニューロンは比較的減少するようである。これらの濃縮された集団を、例えばセルソーティングのような方法によってさらに濃縮することができる。

#### 【0028】

あるいは、本方法によって生じる分化の増加は、（未分化状態にとどまるものと対照的に）分化に向かう細胞の相対百分率が低酸素では増加するものであろう。しかしながら、多能細胞系統を低酸素保温状態で*in vitro*でインキュベーションすることによって、細胞集団の分化の方向を操作または曲げることができるであろう。したがって、分化経路はガスの影響下で変化するので、集団内の1つのタイプの細胞の数および百分率が増加または減少するように制御するために酸素が用いられる。生理的または低酸素レベルによるCNS細胞の濃縮は、したがって以下を含む1つまたは2つ以上のメカニズムの結果であろう：（1）CNS細胞

の絶対数の増加、(2) CNS細胞の選択的生存による濃縮、(3) それらの選択的増殖によるCNSの濃縮、(4) 特定の分化経路の増加。

#### 【0029】

CNS細胞数の増加はいずれも、より多くの細胞をより大きな新しい組織の再生に利用できるということで重要である。たとえ数の増加がなくとも、総細胞数の制限が妥当である場合、または混入する非CNS前駆細胞の影響が所望の出現に対して若しくは物質を十分に特定することに関して陰性であるとき、濃縮は重要である。CNS細胞の生存の強化はいずれも(細胞数の増加がなくとも)、または細胞タイプの濃縮はいずれも、培養が必要とされる設定では有用である(すなわち、細胞療法の施術前に組織を取り扱うために、または細胞をその間生存させておかねばならない他の一切の操作(例えば遺伝子トランスフェクション、薬剤処置、または細胞タイプ分けもしくは他の付加的操作による濃縮)を可能にするために)。

#### 【0030】

本発明のある実施態様は、大気より低い培養状態でCNS細胞(または実際のところ任意の多能幹細胞)を成育させることによってアポトーシス性および非アポトーシス性細胞死レベルが減少することを示す。細胞の生存増加は、おそらくアポトーシスの抑制および非アポトーシス細胞死の抑制の両方によるものであろう。アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は周知の現象で、当業者によく知られた技術によって測定できる。

#### 【0031】

本発明の方法の具体的かつ新規な側面は、そのような方法が全て低酸素環境培養育成条件を使用することである。「低酸素環境条件」とは、本発明では大気酸素より低い一切の培養条件をいう。従って、具体的な実施態様において、低O<sub>2</sub>環境条件は約0.5%~約18%として定義される。理想的には、培養酸素条件は、特定の細胞が、in vivoでより良好に見られるような正常な生理学的酸素条件に可能な限り近く維持される。明らかに、このことは細胞に使用されるそれらの条件は特定の細胞の起源領域に依存するであろうことを意味するであろう。例えば、歯槽起源の細胞は約14%O<sub>2</sub>で増殖することを好むかもしれない；動脈系供給源か

らの細胞は約12%の酸素濃度を好むであろう；一方、脳のある種の領域からの細胞は約1.5%という低い酸素濃度を好むかもしれない。

#### 【0032】

したがって低酸素環境条件は、CNS細胞の分化を促進し、培養細胞のアポトーシスを抑制し、細胞のエクспанジョンを増強し、あるいはそのような細胞を移植で使用しやすくするために用いられるであろう。そのような方法および組成物は以下でさらに詳細に説明する。

#### 【0033】

##### 定義

この章では、本発明のいっそうの理解を進めるために本発明で使用される用語の定義を示す。

”幹細胞”は、比較的未分化の細胞であって、誘導して増殖させることができ、その後1つまたは2つ以上の成熟細胞タイプに分化するが、一方、親の発生潜在能力もまた保持する子孫を産生することができる。多くの生物学的事例では、幹細胞はまた、2つ以上の別の細胞タイプの子孫を産生できるので”多能”であるが、しかしながらこのことは”幹細胞”の要件ではない。自己再生は幹細胞定義におけるまた別の古典的不可欠要素で、本明細書で用いられるとおりの本質的要件である。理論的には自己再生は2つの主要なメカニズムのどちらかによって生じるであろう。幹細胞は非対称的に分裂し、1つの娘細胞は幹細胞状態を保持し、他方の娘細胞は異なる他の固有の機能および表現型を発現することがある。あるいは、集団中の幹細胞のいくつかは対称的に2つの幹細胞に分裂することができ、したがって集団内で全体としていくつかの幹細胞を維持することができるが、一方、集団内の他の細胞は分化子孫のみを産生する。形式的には、幹細胞として開始する細胞は分化表現型に向かって進化していくが、その後”復帰”して幹細胞表現型を再度発現することが可能である。

#### 【0034】

”前駆細胞”は、より原始的な細胞表現型を有する（すなわち発生経路または進化において完全に分化した細胞よりもより初期の段階にある）。しばしば、前駆細胞は顕著なまたは極めて高い増殖能を有する。前駆細胞はまた、細胞が発生

し分化する環境および発生経路に応じて複数の別個の分化細胞タイプまたはただ1つの分化細胞タイプを生じる。幹細胞と同様に、前駆細胞として始まる細胞は分化表現型に向かって変化をとげるが、“復帰”して前駆細胞表現型を再発現することがある。

#### 【0035】

“分化”は発生過程を指し、その過程によって細胞は固有の表現型を身につける（すなわち、他の細胞タイプから区別される1つまたは2つ以上の特性または機能を獲得する）。ほとんどの場合、分化表現型は、ある発生経路の成熟終末点にある細胞表現型を指す。多くの組織（ただし全てではない）では、分化の過程は細胞サイクルから退出することと連携しており、このような事例では、細胞は、それらが分化したとき増殖能を失うかまたは増殖能は極めて制限される。

#### 【0036】

「大気より低い(subatmospheric)」条件とは、海面レベルにおいて、約20%よりも低い、好ましくは約15%よりも低い、より好ましくは約10%よりも低い一切の酸素条件を意味する。本明細書において、用語「大気より低い」は上で定義した「低酸素条件」と互換的に使用される。

「大気O<sub>2</sub>条件」とは、空気中に見出される条件、すなわち、20-21%O<sub>2</sub>である。本明細書において、この用語は「通常のO<sub>2</sub>条件」と互換的に使用される。なぜなら、通常の組織培養インキュベーターは大気O<sub>2</sub>条件に維持されているからである。

「生理学的」酸素レベルとは、健康な組織および器官に通常見いだされる酸素レベル範囲である。それらのレベルは、組織の型（表1）に依存する。しかしながら、この割合は全ての組織において15%より低く、ほとんどの組織で8%よりも低いことに注意する必要がある。従って、生理学的酸素レベルは測定する身体領域に依存して、約15%～約1.5%の範囲であり得る。

「低酸素症」は、酸素の正常な生理学的レベルが細胞または組織に供給されない場合に起こる。「酸素正常状態」とは、問題としている特定の細胞型、細胞状態または組織にとって正常な生理学的酸素レベルをいう。「低酸素条件」は細胞低酸素症を導く条件を言う。これらの条件は細胞型および、組織または器官にお

ける細胞の具体的な構造また位置、およびその細胞の代謝的状态に依存する。重要な点は、過去25年間の細胞生物学研究の殆どにおいて、20-21%の環境大気酸素レベルが「酸素正常状態」と呼ばれ、かつ実験的に採用されてきたが、この過程は生理学的には誤っているということである。こうした歴史的いきさつの中で、多くの細胞培養の文献は環境大気よりも低い酸素の条件を常に「低酸素」と読んでいるが、しかしこの用法も生理学的には誤りである。

「アシドーシス」とは、pHが正常は生理的レベルより低いことを言う。

細胞の「濃縮(enriching)」とは、一つの型の細胞の収率(画分)が出発培養物または調製物中の細胞の画分に対して増加していることを言う。

### 【0037】

”増殖”は、細胞の分裂による集団内の細胞の数の増加(成育)を指す。細胞増殖は、一般に環境(成長因子および他のマイトジェンを含む)に対する反応における多数のシグナルトランスダクション経路の協調的活性化から生じると理解されている。細胞増殖はまた、細胞増殖を阻止するかまたは負の影響を与える細胞内もしくは細胞外シグナルの作用から開放されることによって促進される。

”再生”は、疾患または外傷後の細胞集団、器官または組織の再増殖を意味する。

本明細書で用いられる他の用語は、別に記載がなければ当業者によって一般的に割り当てられた意味を有する。

### 【0038】

#### 中枢神経系細胞

前述のように、本発明の特定の利点は、神経変性障害を軽減するために使用することができるような生存可能な細胞又は組織を生じるためにこれを使用することができることである。このような細胞又は組織は移植時に、移植片と称される。移植用細胞は、卒中、脳及び脊髄の損傷、アルツハイマー病、ハンチントン病及びその他の神経変性障害のためのヒト又は動物の神経；てんかんのための中隔及びGABA作動性細胞；パーキンソン病の治療のための腹側(ventral)中脳又は他のCNSドーパミン作動性細胞；並びに、神経系疾患のため、又は特定の精神障害までもの栄養因子分泌細胞を含むが、これらに限定されるものではない。移植片



として使用される細胞は、初代組織から又は特定の細胞株さえからも由来することができる。更に、本願明細書を通じて言及されたあらゆる細胞型は、成熟細胞であるか又は胎児起源のものであることは理解されなければならない。

#### 【0039】

本発明は、神経疾患の治療のために、増殖及び分化する分化した神経幹細胞を生じるであろう。未分化の神経前駆細胞は、ニューロン及びグリア細胞を生じる神経芽細胞及びグリア芽細胞に分化する。発生時に、神経管に由来する細胞は、CNSのニューロン及びグリア細胞を生じる。発生時に存在する特定の因子、例えば神経成長因子(NGF)は、神経細胞の増殖を促進する。神経幹細胞及び前駆細胞を単離及び培養する方法は、当業者には周知である(Hazel及びMuller、1997年；米国特許第5,750,376号)。適切な神経細胞は適切な固形組織から得ることができ、それらには、哺乳動物の成体、新生児、胎児性または胚性組織が含まれる。マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ラット、ウサギおよび霊長類（ヒトを含む）を含むどんな哺乳動物も本発明に使用することができる。適当な固形組織の具体的な例は、脳組織に由来したニューロン又は中枢神経の支持細胞、生殖細胞又は胚性幹細胞を含む。

#### 【0040】

Hazel及びMullerは、胎仔及び成体の両ラット脳に由来するラット脳神経上皮幹細胞の単離、培養、及び分化の方法を説明している。簡単に述べると、神経前駆細胞を胎仔ラットの中枢神経系の望ましい領域から切り出し、単細胞浮遊液へと分離し、かつ組織培養皿上のマイトジェン塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)を含有する培地中に播種した。最初に、分化したニューロンの多くが死滅する。その後増殖中の細胞が緩衝溶液中に収集される。継代された細胞は、多能性前駆細胞について比較的均質である。ニューロン及びグリア細胞への分化を誘導するために、bFGF含有培地を取り除き、bFGF非含有培地と交換する。

#### 【0041】

このような幹細胞単離から出発するプロトコールにおいては、幹細胞プールを濃縮しかつより多数の細胞への分化を増強するために、大気中よりも低い培養条件を用いることができる。より分化した脳細胞において特定の遺伝子産物をアッ



プレギュレートするためには、最初に播種しかつ分裂した後には、大気中よりも低い／生理的培養条件も使用することができる。大気中よりも低い／生理的培養条件は、移植のための全集団の機能を増強するために、プロセスを通じて使用することもできる。

#### 【0042】

神経幹細胞由来物の検出は、抗体染色により決定することができる。例えば、中枢神経系多能性幹細胞は、中間径フィラメントであるネスチンの高レベル発現により印がつけられる(Hazel及びMuller、1997)。分化したニューロンは抗体TUJ1により(O'Rourkeら、1997)、オリゴデンドロサイトはGalCにより(Bosioら、1996)、及びアストロサイトはGFAP抗体により(Rutkaら、1997)印をつけられる。

#### 【0043】

本発明の方法は、異種遺伝子を含む神経細胞を作出するために使用することができる。異種遺伝子を含む神経起源の細胞を作出しかつこのような細胞を使用する方法は、米国特許第5,750,376号に開示されている(これは本明細書に引用により組入れられるものとする)。

#### 【0044】

##### 培養条件

初代培養物を作成するための適当な培地及び条件は、当該技術分野において周知であり、かつ細胞型に応じて決まる。例えば骨格筋、骨、ニューロン、皮膚、肝及び胚性幹細胞は全て、それらの具体的内容物が異なる培地において増殖される。更にひとつの細胞型のための培地は、実験室毎及び施設毎に著しく異なることができる。一般的原則として、培養の目標が細胞分裂を維持することである場合は、培地に血清が比較的多量に(10～20容量%)添加される。特異的精製された成長因子又は複数の成長因子のカクテルも添加されるか、もしくは時には血清の代わりに使用される。一般的原則として、培養の目標が分化を補強するためである場合は、一般にマイトジェンを伴う血清に限定される(血清約1～2容量%)。分化を促進する及び／又は細胞周期の停止を促進する特異的因子又はホルモンも使用することができる。

#### 【0045】

特異的細胞表現型の選択、特異的細胞型の生育及び増殖、又は特異的細胞型の分化への重大な付随物として、培養時の細胞の増殖及び分化のいずれかの時点で、生理的酸素及び大気より低い酸素の条件を用いることができる。一般に、生理的又は低酸素レベルの培養は、強力な緩衝剤の培地(Hepesなど)への添加、頻繁な培地の交換及びCO<sub>2</sub>濃度の変化のような、培養物のアシドーシスを制限する方法により達成される。

#### 【0046】

細胞は、様々な手段を用い低酸素条件に晒すことができる。特化された実験施設は、酸素レベルが指定された隔離室全体で制御される完全に封じ込められた環境を有することができる。このような特定の領域においては、低酸素レベルが間断なく、細胞の単離、増殖及び分化を通じて維持され得る。このような特殊な領域を有する実験室は非常に少ない。更に生理的又は低酸素培養条件は、予め定められた混合ガスでフラッシュされた市販のチャンバー(例えば、Billups-Rothenberg、サンディエゴ、CAから入手できる)を用いて維持することもできる。補助的に、細胞を供給する前に、同じ混合ガスで培地をフラッシュすることができる。一般に、これらの比較的小さい封じ込めユニットを用いる細胞供給及び継代の間に生理的又は低酸素条件を維持することは可能ではなく、かつそのため、これらの操作の時間は、できる限り短縮されなければならない。適当な湿度、温度、及び二酸化炭素が提供されるならば、あらゆる密閉されたユニットを、生理的酸素又は低い酸素レベルでの培養に用いることができる。

#### 【0047】

酸素に加えて、培養のためのその他の気体は、典型的には約5%二酸化炭素であり、かつ残余は窒素であるが、任意に変動量の酸化窒素(3ppm程度の低濃度から開始)、一酸化炭素並びに不活性及び生体活性の両方のその他の気体を含有することができる。二酸化炭素濃度は、典型的には前述のように約5%の範囲であるが、これは2~10%を変動することができる。酸化窒素及び一酸化炭素の両方が典型的には非常に少量(すなわちppmの範囲)で投与され、これは経験又は文献から決定される。

#### 【0048】

いずれか所定の細胞型又はいずれか特定の望ましい結果にとって最適な生理的又は低酸素レベル条件は、変動するであろう。当業者は、二酸化炭素が一定に維持され、かつ酸素レベル(残余ガスとしての窒素と共に)が変動するような酸素用量反応曲線を作成することにより、適当な大気より低い条件を決定することができる。例えば、CNS細胞のエクспанジョンに関する最適酸素環境培養条件を決定するためには、ある酸素システムから培養を確立するであろう。いくつかの分化した細胞、その他の発生系統又は経路の細胞、更にはCNS細胞からなる最初の培養物が、混合される。様々な酸素レベル(例えば、1%、2%、5%、10%及び15%)に曝露された後のCNS細胞の数及び機能は、そのシステムに適した方法により評価される。一部では、分子マーカーの一群を、細胞集団を迅速に同定するために利用できる。別の場合は増殖アッセイと組合せた単独のマーカーが適しており、その他の場合は増殖アッセイ単独が適している。一部の場合、前述のアッセイの全て又は一部は、推定された幹細胞の分化能を辿るバイオアッセイと組合せられる。全般的に、幹細胞及び／又は前駆細胞の酸素レベルに対する反応を決定するために使用される正確なアッセイは、試験されたシステムの性質、更にはそのシステムに特異的な利用できるマーカー及び技術に応じて決まる。

#### 【0049】

生理的又は低酸素条件のタイミングも、酸素用量反応曲線の一部である。一部の細胞は、単離の間又は単離直後に酸素に多かれ少なかれ感受性であることができる一方で、一部の細胞は培養物中のいずれかの時点以降のみ反応することができる。生理的又は低酸素条件のタイミングは、絶対的及び培養物の他の操作との関係において、最適酸素培養条件を評価する一部である。更に、その他の気体の有糸分裂促進作用は、生理的又は低酸素条件により相乗され得る。様々な遺伝子調節ネットワークは、培養の様々な相の間に低／生理的酸素培養により誘導され得る。細胞のエクспанジョン時の低酸素は、分化時の低酸素により誘導されるものとは異なる遺伝子発現を誘導することができる。

#### 【0050】

これらの細胞は、典型的には低酸素レベル条件に、その他の細胞型と比較して前駆細胞／幹細胞の集団を豊富にするのに十分な時間晒される。典型的には、こ

れは1時間以上、好ましくは3時間以上、より好ましくは6時間以上、及び最も好ましくは12時間以上であり、かつ継続することができる。培養時の温度は、典型的には体芯温度(core body temperature)を反映しているか又は約37℃であるが、約32℃及び約40℃の間を変動することができる。別の重要な実施態様は、単純に細胞絶対数の増大を達成するか又は細胞の生存を促進することができる。

低又は生理的酸素培養条件への最初の曝露後に、望ましい結果に応じて、細胞を、これらの条件において維持するか、又は正常な実験室酸素条件に戻すことができる。

#### 【0051】

CNS細胞の単離のための初期培地、これらの細胞の増殖培地、及びこれらの細胞の分化培地は、同じ又は異なって良いことは理解される。全ては、低又は生理的酸素レベル培養と組合せて使用することができる。この培地は、様々な成長因子、サイトカイン、血清などを補充することができる。適当な成長因子の例は、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、上皮成長因子(EGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF $\alpha$ 及びTGF $\beta$ )、血小板由来成長因子(PDGFs)、肝細胞成長因子(HGF)、インスリン様成長因子(IGF)、インスリン、エリスロポイエチン(EPO)、及びコロニー刺激因子(CSF)がある。適当なホルモン培地添加物の例は、エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、又はデキサメタゾンのようなグルココルチコイドである。サイトカイン培地添加物の例は、インターフェロン、インターロイキン、又は腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )である。酸素レベルは添加物に対する細胞応答、添加物の有効期間又はそれらの生体活性に影響を及ぼすその他の性質を変更し得るので、当業者は、添加物及び培地成分を様々な酸素レベルで試験するであろう。加えて、細胞が生育している表面には、細胞の生存、生育及び／又は分化に寄与する様々な基質を置くことができる。これらの基質は、ラミニン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリオルニチン及びフィブロネクチンを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0052】

生育及び分化の促進のための更なる因子

本願明細書に記したように、本発明はCNS細胞の生存、分化及び表現型の完全

性を増大する方法を提供する。この方法は一般に、*in vitro*におけるこれらの細胞の生理的酸素パラメータ内での生育に関する。現時点で、このような細胞の生存を増加することがあるその他の因子を指摘している文献は豊富である。これらの因子のいくつかを本発明の育成条件と組合せて使用することが有用であろうと考えられている。

#### 【0053】

この関心の多くは、栄養因子の発見に焦点が当てられている。これらの因子は、移植により調製されたドーパミン作動性細胞の生存を増大し；線条へ移植された胚性ニューロンの移植後の*in situ*生存を維持し；移植片の容積を増すことに加え、これにより、*in vitro*及び*in vivo*の両方において作用することが示されているような尾状核及び被殻のより大きい部分を再一神経支配することができる。

#### 【0054】

NGF、bFGF、EGF、IGF I及びII、TGF  $\beta$  1-3、PDGF、脳由来の成長因子(BDNF)、神経節由来の成長因子(GDNF)、ニューロトロフィン(NT)-3、NT-4、及び毛様体神経栄養因子(CNTF)のような栄養因子(Engelke及びBohn、1996；Mayerら、1993a及び1993b；Knuselら、1990、1991；Poulsenら、1994；Nikkhahら、1993；Othbergら、1995；Hymanら、1991)が研究され、かつ*in vitro*において顕著な作用を有することが示されている。

#### 【0055】

霊長類におけるMPTP及び6-OHDA病巣は、神経変性障害のあるモデルである。このような病巣の作用は、移植術前の細胞浮遊液へのNGF又はbFGFの添加により、霊長類及びラットにおいて逆行することができることが示されている(Gashら1996)。更にこれらの因子は、細胞浮遊液に移植術前に添加した場合に、移植片の生存を増大することも示されている(Chenら、1996；Dunnett及びBjorkland、1994)。追加の試験は、NGFによりレトロウイルスを使って誘導された神経前駆細胞(CINP)細胞株(Martinez-Serranoら、1995)、及びBDNFにより誘導されたアストロサイト(Yoshimotoら、1995)に由来した移植されたニューロンにおいて移植片生存率の上昇を示した。GDNFは、移植片生存を増大し、繊維の伸長を増大させかつラ



ット線条における6-ヒドロキシドーパミン病巣の後の行動作用を緩和することが示されている(Sauerら、1994；Bowenkampら、1995；Rosenbladら、1996；Olson、1996)。

従ってin vitro又はin vivoのいずれかにおいてCNS細胞の生存を延長するようなこれら及び他の因子は、本発明において説明された増殖及び維持の条件下で使用する事が考察されている。

#### 【0056】

##### EP0 による大気O<sub>2</sub>での分化の誘導

別の実施態様において、ドーパミン作動性分化に対する低酸素の作用を模倣するためにEP0を使用することができる。すなわち、大気酸素レベルでのEP0は、幹細胞、CNS前駆細胞、又はそれらの子孫の分化を促進し、ドーパミン作動性細胞を作出するために使用される。中脳前駆細胞は、特に好ましい。この実施態様において使用されるEP0の量は、ドーパミン作動性細胞を少なくとも約10%以上、好ましくは20%、より好ましくは50%作出するのに十分な量である。好ましくは、飽和濃度のEP0が増殖相、分化相又は両相の間に培養物に添加される。この培養物はEP0と、少なくとも約1日以上、好ましくは2日、より好ましくは5日間接触される。例えばCNS前駆細胞の培養物は、増殖相の間は5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>（平衡N<sub>2</sub>）を含有する大気内で5日間、飽和濃度のEP0で培養され、かつ引き続き分化相の間は3日間10%EP0で培養することができる。この大気は、20%O<sub>2</sub>を含有することが好ましいが、より低いO<sub>2</sub>濃度も使用することができる。

#### 【0057】

##### 移植法

実験室及び臨床での研究は、CNSへの細胞移植が、パーキンソン病のような神経変性障害の重要な別の治療モダリティとなり得る可能性があることを示している(Wictorinら、1990；Lindvallら、1990；Sanbergら、1994；Bjorklund及びStenevi、1985；Freemanら、1994)。一部の症例において、移植された神経組織は生存し、かつレシピエントすなわち宿主のCNSとの結合を形成する(Wictorinら、1990)。宿主にうまく受け入れられた場合は、移植された細胞及び／又は組織は、前記障害に関連した行動上の欠陥を改善することが示されている(Sanbergら、19



94)。この種の治療が成功するための必須の工程は、移植のために利用できる十分生存可能な細胞を獲得することである。本明細書に記載する生理学的／大気より低い培養条件は移植のために有用なCNS細胞の特定の集団を分化させるため、および、種々の培養系から由来する入手可能なCNS細胞数のエクспанジョンに使用することができる。

#### 【0058】

前述の細胞培養に加えて、胎児神経組織が、神経移植の別の重要な給源である(Lindvallら、1990；Bjorklund、1992；Isacsonら、1986；Sanbergら、1994)。別の生存可能な移植片の給源は、副腎細胞並びに神経成長因子及び栄養因子を分泌する様々な細胞型を含む。神経変性障害に関する再生治療プロトコールのような神経組織移植の分野が、多くの注目を浴びており、その結果臨床試験が進行している。今日までこの分野の主要な問題点は、十分に生存可能な細胞を得る能力が欠けていることであった。本発明は、それらの神経変性疾患のための適当な移植片としての利用能を失うことを防ぐような状態で、このような組織を維持する方法を提供する。

#### 【0059】

現在は、細胞移植術の方法は、当業者には周知である(米国特許第5,762,926号；米国特許第5,650,148号；米国特許第5,082,670号)。神経移植又は移植術は、中枢神経系又は脳室腔又は宿主脳表面の硬膜下への細胞の移植に関っている。移植が成功する条件は以下を含む：1)インプラントの生存率；2)移植部位への移植片の維持；及び、3)移植部位での最低量の病理学的反応。

#### 【0060】

例えば胚性脳組織のような様々な神経組織の宿主脳への移植法は、Neural Grafting in the Mammalian CNS、Bjorklund及びStenevi編集(1985年)、Das、第3章、23～30頁；Freed、第4章、31～40頁；Steneviら、第5章、41～50頁；Brundinら、第6章、51～60頁；Davidら、第7章、61～70頁；Seiger、第8章、71～77頁(1985年)に記されており、これは本願明細書引用により組入れられている。これらの手法は、移植時に脳実質(brain parenchyma)へ対置するために、実質内移植(intraparenchymal transplantation)、すなわち宿主脳内の組織の注射又は沈着に

より達成される(脳外側又は実質外への移植と比較して)宿主内への移植を含む(Das、前掲)。

#### 【0061】

実質内移植のふたつの主な手法は以下のものである：1)ドナー細胞の宿主脳実質内への注入、又は2)宿主脳実質を露出するための手術手技による腔の形成、その後の腔への移植片の沈着(Das、前掲)。両方法共、移植時に移植片と宿主脳組織の間に実質の付着を提供し、かつ両方法共移植片と宿主脳組織の間の解剖学的一体化を促進する。これは、移植片が宿主脳の一体化された部分でありかつ宿主生命を生存させることが必要であるならば重要である。

#### 【0062】

あるいは、この移植片は、脳室内、例えば大脳室内、又は硬膜下、すなわち介入軟膜(intervening pia mater)又はクモ膜及び軟膜により宿主脳実質から隔てられた宿主脳の表面に配置することができる。脳室への移植術は、ドナー細胞の注入によるか、又はその後移植片の転置を防ぐために脳室内に移植される固形組織の栓(plug)を形成するための3%コラーゲンのような基質内で細胞を増殖することにより達成することができる。硬膜下移植術のためには、硬膜にスリットを形成した後、脳表面の周りに細胞が注入される。宿主脳の選択された領域への注入は、ドリルで穴あけしかつ微量注入器の針を挿入することができるように硬膜を穿刺することにより行うことができる。微量注入器は、脳定位固定装置に装着されることが好ましく、かつ針を脳又は脊髄の所望の位置に配置するために3次元定位固定性座標が選択される。

ドナー細胞は、被殻、基底核、海馬皮質、脳の線条又は尾状領域、更には脊髄に導入することもできる。

#### 【0063】

移植のためには、細胞浮遊液を、注射器で吸引し、かつ麻酔をかけた移植レシピエントへ投与する。この手法を用いて、複数回の注入を行うことができる。ドナー組織の年齢、すなわち発達段階は、移植術後の細胞生存の成功に影響を及ぼすことがある。

従って細胞浮遊液の手法は、ドナー細胞の脳又は脊髄のいずれかの予め定めら

れた部位への移植術を可能にし、これは比較的非外傷性であり、同じ細胞浮遊液を用いるいくつかの異なる部位又は同一部位への同時に多回移植術を可能にし、かつ異なる解剖学的領域由来の細胞の混合物を可能にする。多回移植術は、細胞型の混合物、及び／又は細胞に挿入される導入遺伝子の混合物からなる。好ましくは、1回の移植術当たり約 $10^4$ ～約 $10^8$ 個の細胞が導入される。

#### 【0064】

脊髄への移植術について好ましい腔への移植に関しては、例えば脳を覆う骨の除去及びゲルフォームのような材料による出血の停止により、組織がCNSの外面に密接した領域から除去され、移植腔を形成する(Steneviら、Brain Res.、114: 1-20(1976))。吸引を用いて腔を形成することができる。その後移植片が、腔内に配置される。細胞の注入又は固形組織インプラントを用いて、1回より多い移植を、同じ腔に行うことができる。

#### 【0065】

外傷を受けた脳へのドナー細胞の移植は、例えば移植術を試みる前に、損傷部位を浄化しかつ出血を停止しなければならないといった、様々な手技が必要であろう。加えて、ドナー細胞は、外傷を受けた脳の病理学的環境内で移植片の単離を防ぐために宿主脳のあらゆる病巣又は腔を満たすのに十分な増殖能を有さなければならない。

#### 【0066】

##### 細胞表現型の測定

特定の実施態様において、細胞の分化又は他の修飾が生じているかどうかを決定するために、大気より低い酸素条件において生育している細胞の表現型を追跡することが必要なことがある。これを行うために、メッセージレベル、タンパク質レベル、細胞下局在、機能アッセイ又は形態学的変化の追跡を含む、様々な方法が使用される。メッセージレベルを追跡する方法は、PCR（登録商標）（米国特許第5,364,790号；米国特許第4,800,159号；米国特許第4,683,195号）、In Situ ハイブリダイゼーション（米国特許第4,888,278号；米国特許第4,886,741号；米国特許第5,506,098号；米国特許第5,225,326号；米国特許第5,521,061号；米国特許第5,538,869号；米国特許第5,665,540号）、RNaseプロテクションアッセイ、

及び単細胞PCR（登録商標）がある。タンパク質レベルを追跡する方法は、抗体染色、HPLC、ウェスタンブロット又は免疫沈降法を使用することができる。これらの技術は、全て当業者には周知である。

#### 【0067】

迅速な遺伝子検出及び配列決定技術の利点と組合せた2種の細胞型又は集団において示差的に発現された遺伝子を検出できるということを、酸素濃度の変動下で培養された細胞における遺伝子発現を比較するために使用することができる。

ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、2種の比較的類似した細胞型間で、又はある状態から別の状態への細胞の逐次的な変化時に、表現型の差異に寄与する遺伝子を解明する。例えば、ディファレンシャルディスプレイ技法を用い、Kocherら(1995)は、正常な腎実質と比較して腎細胞癌腫においてアップレギュレーションされた遺伝子を選択した。この方法により、Kocherら(1995)は、正常上皮細胞集団において発現されることは稀な、癌腫の大半の悪性上皮細胞において発現され、かつ結腸、乳及び肺起源の癌腫において著しく過剰発現される遺伝子(DD96)を単離することができた。同様の技法を用いて、通常条件、対、低酸素レベル条件でインキュベーションした細胞における遺伝子発現を比較することができる。次にある集団においてその他よりもアップレギュレーションされた遺伝子をプローブとして用い、他の細胞集団又は異なる培養条件下(すなわち、該遺伝子発現に影響を及ぼし得る化合物又は環境刺激が存在する)での同じ細胞集団における遺伝子の発現をスクリーニングする。

#### 【0068】

Kangら(1998)は、豊富又は稀有に示差的に発現された遺伝子の両方の迅速かつ効率的な同定及びクローニングを可能にする、相互引き算式(reciprocal subtraction)ディファレンシャルRNAディスプレイ(RSDD)法を開発した。この技術は、アデノウイルスで形質転換されたげっ歯類細胞が激しい形質転換状態を展開する際のような、癌の進行時に生じた遺伝子発現の変動を分析するために使用された(Kangら、1998)。この方法は、進行の関数としての発現及び進行の関数としての抑制された発現を示した既知及び未知の配列の同定及びクローニングをもたらした(Kangら、1998)。このRSDD技術を使用して、室内大気条件、対、大気より低い

条件において、細胞の維持、増殖および／または前駆細胞又は幹細胞からの完全に分化した細胞へ分化時の際の、細胞間の遺伝子発現を比較することができる。

#### 【0069】

ディファレンシャルディスプレイ法を、迅速なDNA配列決定及び検出法と組合せて用いることができ、これにより比較的短時間に非常に多くの遺伝子をスクリーニングまたは配列決定する能力を可能にする。米国特許第5,800,992号は、アレイ内の相補的ポリヌクレオチドを用いて、2種の細胞型の間で複数の遺伝子の示差的発現を検出する方法を提供している。このような技術は、ポリヌクレオチドが基板上に付着されているのが、コンピュータのマイクロプロセッサチップに似ているので、通常「DNAチップ」技術と称されている。更に、DNAチップを用いて遺伝子を配列決定する方法も記されている。

#### 【0070】

加えて同様の技術が米国特許第5,834,181号にも開示されており、これは1個のヌクレオチド置換のような遺伝子の小さい変化を検出するために同様の技術を使用し、そのため細胞表現型の変化に繋がる遺伝子における突然変異の検出が可能である。

単一細胞逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法も、通常本発明において育成された細胞表現型の追跡に有用であろう。このような技術は、例えばCornelison及びWold(1997)に説明されている。

#### 【0071】

Cornelison及びWoldの単細胞RT-PCR技術は、一度に多数の遺伝子の発現を決定することを可能にし、並びに骨格筋衛星細胞を同定しかつ本発明の低／生理的酸素条件下でインキュベーションした場合のそれらの活性化状態を決定するために使用することができる。

#### 【0072】

通常使用される別の検出法は、RNase保護アッセイであり、ここでは放射標識されたRNAプローブが、個体から得た総細胞RNAのような、被験RNA集団とRNAプローブの相補的セグメントと被験RNAがハイブリダイズするような条件下で混合される。その後、この混合物にRNaseが添加され、未保護(ハイブリダイズしていな



い)、1本鎖プローブ及び被験RNAを破壊する。全ての1本鎖RNAが破壊された場合、保護されたRNAの短い断片のみが残留し、これは被験RNAの特定のRNA組成物を診断するために電気泳動により分析することができる。保護された2本鎖RNA断片は、分析の前に変性され、検出可能な、標識された1本鎖RNAプローブ断片として利用することができる。

#### 【0073】

##### 疾患モデル

一旦特定の細胞セットが作成されたならば、当然、これらの細胞が疾患モデルに適用できるかどうかテストすることが必要であろう。パーキンソン病及び他の神経変性疾患の動物モデルが現在当業者に周知である。

#### 【0074】

例えばパーキンソン病ラットモデルは、生理食塩水-アスコルビン酸6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を内側前脳束に一側性注入を行うことにより作出することができる。これは、最終的にパーキンソン挙動を模倣する病巣を形成する。形成された病巣の完全性は、アポモルヒネ又はアンフェタミンのいずれかにより誘導される回旋行動を監視することにより可能である(Ungerstedt及びArbutnot t、1970)。1分間に7回転より多い率で回転する動物は(Schmidtら、1982)、適当な病巣を有すると推定することができる(アポモルヒネ投与後の少なくとも7回の反対側性回転/分、及びアンフェタミン投与後の病巣側に向かう少なくとも7回の同側性回転/分)。

#### 【0075】

このようなモデルを用いて、ベースライン時の回旋行動を確立することができる。その後、本発明で増殖した細胞を、前述のラットモデルに移植することができる。何らかの回旋行動の減少は、適当な治療的価値のある細胞移植の指標となるであろう。

#### 【0076】

##### 遺伝子の置換/増強の用途

場合により、本発明の方法を用いて得られたCNS細胞を操作し、所望の遺伝子産物を発現することができる。遺伝子治療を使用するため、遺伝子産物を置換す

るため、組織の再生を促進するため、疾患を治療するため、もしくは患者への移植後の細胞の生存を改善する(すなわち拒絶反応の防止)ために、細胞を修飾することができる。

この実施態様において、CNS細胞は、エクспанジョン及び分化の前に、トランスフェクションされる。細胞のトランスフェクション技法は当該技術分野において公知である。

#### 【0077】

当業者は、トランスフェクションされた細胞に、又はより間接的にはレシピエント患者／動物に、有益な特性を運ぶであろう多数の遺伝子を構想することができるであろう。加えられた遺伝子は、実施態様に応じて、最終的にレシピエント細胞及びその子孫全てにおいて維持されてもよく、又は単に一過性に維持されるのみでもよい。例えば、チロシンヒドロキシラーゼ、又はVMAT1もしくはVMAT2のようなモノアミン輸送体をコードしている遺伝子を、特定のCNS細胞にトランスフェクションし、パーキンソン病対象への移植術に適した適当な治療的細胞を提供することができる。使用することができるその他の遺伝子には、GABA-デカルボキシラーゼ、エンケファリン、ドーパデカルボキシラーゼ(AADC)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロピン(NT)-3、NT-4、及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)が含まれる。

#### 【0078】

一部の状況において、細胞を1種よりも多い遺伝子でトランスフェクションすることが望ましいことがある。勿論、前述の治療的遺伝子はひとつの例であり、かつ当業者は、遺伝子の発現及び／又は機能の異常に起因したいずれかの神経変性障害は、遺伝子の置換及び／又は増大により治療することができることを理解するであろう。このような障害及びそれに関連した遺伝子は、当業者には周知である。

一部の状況においては、遺伝子産物を分泌させることが望ましい。このような場合、遺伝子産物は、該タンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含むことが好ましい。

#### 【0079】

本願明細書において使用されたウイルスベクターは、アデノウイルス(米国特許第5,824,544号；米国特許第5,707,618号；米国特許第5,693,509号；米国特許第5,670,488号；米国特許第5,585,362号；これらは各々本願明細書に参照として組入れられている)、レトロウイルス(米国特許第5,888,502号；米国特許第5,830,725号；米国特許第5,770,414号；米国特許第5,686,278号；米国特許第4,861,719号、これらは各々本願明細書に参照として組入れられている)、アデノ随伴ウイルス(米国特許第5,474,935号；米国特許第5,139,941号；米国特許第5,622,856号；米国特許第5,658,776号；米国特許第5,773,289号；米国特許第5,789,390号；米国特許第5,834,441号；米国特許第5,863,541号；米国特許第5,252,521号；米国特許第5,252,479号；これらは各々本願明細書に参照として組入れられている)、アデノウイルスーアデノ随伴ウイルスハイブリッド(米国特許第5,856,152号、これは本願明細書に参照として組入れられている)、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルス又はヘルペスウイルス(米国特許第5,879,934号；米国特許第5,849,571号；米国特許第5,830,727号；米国特許第5,661,033号；米国特許第5,328,688号；これらは各々本願明細書に引用により組入れられている)ベクターであることができる。

#### 【0080】

非ウイルスベクターによる発現構築物の送達も考察されている。このような送達は、微量注入法(米国特許第5,612,205号)、電気穿孔法(米国特許第5,507,724号；米国特許第5,869,326号；米国特許第5,824,547号；米国特許第5,789,213号；米国特許第5,749,847号；米国特許第5,019,034号；Tur-Kaspaら、1986；Potterら、1984)、リン酸カルシウム共沈降法(Graham及びVan Der Eb、1973；Chen及びOkayama、1987；Rippeら、1990)、DEAEデキストラン誘導法(Gopal、1985)、受容体が媒介した導入法(Wu及びWu、1987；Wu及びWu、1988)、リポソーム媒介した導入法(米国特許第5,631,018号；米国特許第5,620,689号；米国特許第5,861,314号；米国特許第5,855,910号；米国特許第5,851,818号；米国特許第5,827,703号、米国特許第5,785,987号；Nicolau及びSene、1982；Fraleyら、1979)、デンドリマー法(米国特許第5,795,581号；米国特許第5,714,166号；米国特許第5,661,025号)、剥き出しのDNA注入法(Harland及びWeintraub、1985)、及びパーティクル

ボンバードメント法(米国特許第5,836,905号；米国特許第5,120,657号；Yangら、1990)がある。

#### 【0081】

所望の遺伝子は、通常それ自身のプロモーター又は外来プロモーターに機能的に連結され、これらはいずれの場合も遺伝子産物の転写を媒介する。プロモーターは、制限された又は全般的な組織型の発現を起動するそれらの能力を基に、又はそれらが促進する発現レベルか、もしくはこれらが添加された化学物質、薬物又はホルモンといかに反応するかを基に選択される。特に考察されたプロモーターは、CMV IE、SV40 IE、 $\beta$ -アクチン、コラーゲンプロモーター、THプロモーター、AADCプロモーター及びネスチンプロモーターを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0082】

遺伝子の発現を変更するその他の遺伝子調節配列は、同時トランスフェクションすることができる。いくつかの実施態様において、宿主細胞DNAは、プロモーター及び／又は追加の調節配列を提供することができる。エンハンサー又は高レベルの発現を生じるシステムのような発現を増強する他のエレメントも、同じく含むことができる。

#### 【0083】

哺乳類細胞における遺伝子ターゲティング法は、当業者に周知である(米国特許第5,830,698号；第5,789,215号；第5,721,367号及び第5,612,205号)。「遺伝子ターゲティング」は、細胞の染色体に位置する遺伝子の全体又は一部が、異種ヌクレオチド断片により置換されることを意味する。この断片は、主に該遺伝子に対する特異的突然変異を伴う標的化された遺伝子配列を含むことができるか、又は第二の遺伝子を含むことができる。第二の遺伝子は、プロモーターに機能的に連結されるか、又は転写に関して該細胞のゲノム内に含まれたプロモーターに依存的である。好ましい実施態様において、第二の遺伝子は、該遺伝子を欠いている細胞に対して毒性のある化合物に対する耐性を細胞に付与する。このような遺伝子は、典型的には抗生物質耐性遺伝子と称される。その後この遺伝子を含む細胞は、毒性化合物の存在する中での該細胞の培養により選択される。

## 【0084】

## その他の細胞型の用途

前述の考察の大半はCNS細胞の育成及び培養に焦点を合わせているが、本発明の技術は、その他の種類の細胞の増殖にとっても有用であることは理解されなければならない。このように、本願明細書において提供された技術は、移植治療において常用されるあらゆる細胞の増殖に有用であることが意図されている。例えば、このような細胞は、糖尿病のための島細胞；筋ジストロフィーのための筋原細胞；肝疾患のための肝細胞；創傷治癒及び／又は火傷のための皮膚移植片、並びに造血系及び遺伝子疾患のための骨髄又は幹細胞であることができる。加えて、1998年11月18日に出願された米国特許出願第09/195,569号(これは本明細書に参照として組入れられている)の開示は、本発明と組合せることが有用な別の例を提供するであろう。

## 【0085】

## 実施例

下記実施例は、本発明の好ましい実施態様を明らかにするために含まれている。当業者には、本発明者により発見された代表的技術を辿るこれらの実施例に記された技術は、本発明の実践において良好に機能し、従ってその実践のための好ましい態様を構成するために考察することができる。しかし当業者は、本発明の開示に関して、明らかにされた具体的な実施態様において、多くの変更を行うことができること、及び本発明の精神及び範囲を逸脱することなく同様又は類似の結果を得ることを理解しなければならない。

## 【0086】

## 実施例1

## 材料及び方法

## CNS幹細胞の培養

動物を、NIHガイドラインに準じ、飼育及び処置した。ラット胚の外側神経節隆起(E14)又は中脳(E12)から切除した細胞を機械的に分離し、予めポリオルニチン／フィブロネクチンで被覆したプラスチック製24-ウェルプレート(Costar社)又は12mmガラスカバースリップ(Carolina Biologicals社)上に播種し、かつbFGF



を伴う規定培地で増殖した(Studerら、1998; Joheら、1996)。概してbFGFは、培養の4~6日後に培地から取り除いた。プラスチック製48-ウェルプレート(Costar社)において、クローンアッセイを行った。一部の試験において、組換えヒト(rh)EP0、rhVEGF<sub>165</sub>又は組換えマウス(m)FGF8b、又はそれらの中和抗体(全てR&D Systems社から入手)を、下記の濃度で培養物に添加した: EP0 0.5U/ml、EP0中和抗体10 µg/ml、FGF8 250ng/ml、FGF8b中和抗体5 µg/ml、VEGF 50ng/ml、VEGF中和抗体0.5 µg/ml。EP0についての用量反応決定を、0.05U/ml、0.5U/ml、5U/ml及び15U/mlで行い; 抗-EP0について、10 µg/ml及び100 µg/mlで行った。全ての実験の結果は、少なくとも2つの独立した培養シリーズにより確認した。

#### 【0087】

##### 低酸素培養

培養物を加湿した携帯単離用チャンバー(Bi1lups-Rothenberg社、デルマール、CA)に配置し、毎日ガス混合物(1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> + 94%N<sub>2</sub>)をフラッシュした。周囲大気中の正確なO<sub>2</sub>レベルは、チャンバーフラッシュの長さによって決まり(15L/分での90秒のフラッシュは6%O<sub>2</sub>を達成し、6分間のフラッシュは1.5%O<sub>2</sub>を達成した)、これはO<sub>2</sub>-感受性電極システム(OS2000、Animus社、フレーザー、PA)が利用できるようになるまでは標準化されなかった。従って、「低いO<sub>2</sub>」条件は、環境O<sub>2</sub> 3±2%の範囲を表しており、これはほぼ正常な脳組織レベルである(表1)。温度37°Cに維持するために、チャンバー全体を、インキュベーターの中に収容した。

#### 【0088】

##### BrdU取り込み及びTUNEL分析

ブロモデオキシウリジン(10 µM)を、固定直前に、正確に60分間培養物に添加した。抗-BrdU染色を、製造業者のプロトコールに従い行った(Amersham Life Sciences社)。製造業者のプロトコールに従いTUNEL反応(Boehringer-Mannheim社)を行った。TUNEL+細胞を、FITC標識物のペルオキシダーゼ転換後に、金属増強したDAB反応(Pierce社)により可視化した。

#### 【0089】

##### 免疫組織化学

細胞は、4%パラホルムアルデヒド+0.15%ピクリン酸/PBSで固定した。標準の免疫組織化学的プロトコールに従った。下記の抗体を用いた：幹細胞/前駆細胞の特徴決定：ネスチンポリクローナル抗体#130 1:500 (Martha Marvin & Ron McKay社)、PSA-NCAM、En1及びFP4(全てモノクローナル抗体1:2、Developmental Studies Hybridoma Bank、Tom Jesselより提供)。幹細胞分化： $\beta$ -チューブリンタイプIII (Tuj1)モノクローナル抗体1:500及びポリクローナル抗体1:500(両方共BabCO社)、04モノクローナル抗体1:5 (Boehringer-Mannheim社)、ガラクトセレブロシド (GalC)モノクローナル抗体1:50 (Boehringer-Mannheim社)、グリア繊維酸性タンパク質(GFAP) 1:100 (ICN Biochemicals社)。ニューロンサブタイプの分化：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)ポリクローナル抗体1:200~1:500 (PelFreeze社、ロジャー、AK)又はモノクローナル抗体1:2000 (Sigma社)、GABAポリクローナル抗体1:500 (Sigma社)、グルタミン酸1:500 (Sigma社)、ドーパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼ(DBH) 1:100 (Protos Biotech社)。適当な蛍光-標識した(Jackson ImmunoResearch社)又はビオチン化した(Vector Laboratories社)二次抗体、その後の金属-増強したDAB反応(Pierce社)を用いて可視化した。

#### 【0090】

##### 細胞計測及び統計学的手法

細胞計数及び定量化には、フラクショネーター技術を用いる均一なランダム試料採取法を用いた(Gundersenら、1988)。統計学的比較は、2群より多くが関連した場合、事後Dunnett検定によるANOVAを用いて行った。データが正規分布していない場合は、非-パラメトリック検定(Mann-Whitney U)を用い、低O<sub>2</sub>対20%O<sub>2</sub>の結果を比較した。データは、平均±SEMで表した。

#### 【0091】

##### ドーパミン含量の逆相-HPLC決定

培地、HBSS、及びHBSS+56mM KClの培養上清を、オルトリン酸及びメタ重亜硫酸塩で安定化し、かつ分析まで-80℃で保存した。安定化、アルミニウム吸着、平衡化、及びドーパミン溶離は、これまでに説明されている(Studerら、1998; Studerら、1996)。結果は、変動する流量及び感度で、ドーパミン標準品に対して標準化した。

## 【0092】

## ウェスタンブロット

細胞ペレットを、 $-80^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。ペレットは、プロテアーゼインヒビター(Complete、Boehringer-Mannheim社)が入った、20mM Hepes、pH7.6、20%グリセロール、10mM NaCl、1.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2mM EDTA、0.1%トリトン-X-100中に溶解し、ホモジナイズし、かつ氷上で1時間インキュベーションした。遠心後、上清タンパク質濃度を、BCA (Pierce社)によりアッセイした。ウェスタン法のためには、TBST中の5%ミルクでブロックし、一次TH抗体(Pel-Freeze社、ロジャース、AK)を1:500で使用し、かつ二次抗体は、HRP-複合ヤギ抗-ウサギ抗体(Pierce社)1:5000であった。シグナルは、SuperSignal (Pierce社)で検出した。

## 【0093】

## RT-PCR (登録商標)

培養物を、PBSで1回洗浄し、その後2ml (6cm皿1枚当たり) Trizol (Life Technologies社)で可溶化し、その後 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。製造業者(Gibco Life Technologies社)の推奨に従い、RNA抽出を行った。ひとつの条件につき10  $\mu\text{g}$ のRNA逆転写に、Superscriptキット(Gibco Life Technologies社)を用いた。PCR条件は、直線状の増幅範囲を決定するように、 $\text{MgCl}$ 濃度及びサイクル数を変更し最適化した。増幅産物は、サイズ別に同定し、かつDNA配列決定により確定した。親切にもTHは、Vera Vikodem、NIDDK、30サイクル、 $56^{\circ}\text{C}$ 、300bpにより提供された。他の産物については、プライマー配列、サイクル数及びアニーリング温度を、表2に示した。

## 【0094】

## 【表2】

表2. PCRのためのプライマー配列、サイクル数およびアニーリング温度

識別子	フォワードプライマー
GAPDH	CTCGTCTCATAGACAAGATGGTGAAG (配列番号:1)
VHL	CCTCTCAGGTCATCTTCTGCAACC (配列番号:3)
HIF1 $\alpha$	GCAGCACGATCTCGGCGAAGCAAA (配列番号:5)
EP0	CGCTCCCCACGCCTCATTTG (配列番号:7)
VEGF	GTGCACTGGACCCTGGCTTTACT (配列番号:9)
Nurr1	TGAAGAGAGCGGAGAAGGAGATC (配列番号:11)
Ptx3	CGTGCGTGGTTGGTTCAAGAAC (配列番号:13)
SHH	GGAAGATCACAAGAACTCCGAAC (配列番号:15)
FGF8	CATGTGAGGGACCAGAGCC (配列番号:17)
En1	TCAAGACTGACTACAGCAACCCC (配列番号:19)
FGFR3	ATCCTCGGGAGATGACGAAGAC (配列番号:21)
GDNF	Moreau et al., 1998 に従った
BDNF	GTGACAGTATTAGCGAGTGGG (配列番号:23)

【0095】

【表3】

表2. つづき

識別子	リバープライマー
GAPDH	AGACTCCACGACATACTCAGCACC (配列番号:2)
VHL	AGGGATGGCACAAACAGTTCC (配列番号:4)
HIF1 $\alpha$	GCACCATAACAAAGCCATCCAGGG (配列番号:6)
EPO	AGCGGCTTGGGTGGCGTCTGGA (配列番号:8)
VEGF	CGCCTTGCAACGCGAGTCTGTGTT (配列番号:10)
Nurr1	TCTGGAGTTAAGAAATCGGAGCTG (配列番号:12)
Ptx3	GCGGTGAGAATACAGGTTGTGAAG (配列番号:14)
SHH	GGATGCGAGCTTTGGATTCATAG (配列番号:16)
FGF8	GTAGTTGTTCTCCAGCAGGATC (配列番号:18)
En1	CTTTGTCCTGAACCGTGGTGGTAG (配列番号:20)
FGFR3	GGATGCTGCCAAACTTGTTCTC (配列番号:22)
GDNF	
BDNF	GGGTAGTTCGGCATTGC (配列番号:24)

【0096】

【表4】

表2. つづき



識別子	条件
GAPDH	28 サイクル., 59°C, 305bp
VHL	35 サイクル., 60°C, 208bp
HIF1 $\alpha$	30 サイクル., 59°C, 235bp
EPO	30 サイクル., 60°C 385 bp
VEGF	30 サイクルles, 60°C, 474bp (VEGF-1, VEGF-2 AND VEGF-3 を検出)
Nurr1	30 サイクル., 55°C, 255 bp
Ptx3	35 サイクル., 60°C, 257 Bp
SHH	30 サイクル., 59°C, 354bp
FGF8	35 サイクル., 60°C, 312bp
En1	30 サイクル., 60°C, 381bp
FGFR3	30 サイクル., 55°C, 326 bp
GDNF	
BDNF	35 サイクル, 56°C, 213 bp

## 【0097】

### 実施例2

結果：低O<sub>2</sub>は線条及び中脳前駆細胞のエクспанジョンを増大させる

CNS前駆細胞由来物として広く使用されているE14ラットの線条を、低O<sub>2</sub>中で培養し、bFGFの存在下で広範な播種密度にわたって、20%O<sub>2</sub>培養物よりも平均2～3倍多い細胞を得た。(塩基性FGFは、発生時の脳の多くの領域から得られる幹細胞にマイトジェンとして作用する。bFGFの除去は、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへの分化を開始する。)(図1)。同様の結果が、E12中脳前駆細胞においても得られた。全ての結果について、データは、少なくとも2回の個別の一連の培養により証明された。

## 【0098】

### 細胞増殖及び細胞死に対する作用

低O<sub>2</sub>中で得られた増大した細胞が、増大した増殖、低下した細胞死、又はこれら両方に起因するものかどうかを検証するために、前駆細胞を、固定直前に複数

の時点でブロモデオキシウリジン(BrdU)で1時間パルスすると、前駆細胞は増殖又は分化した。中脳及び線条の両前駆細胞は、低 $O_2$ 中で育成した場合に通常の培養と比べて増大したBrdU標識指標を示した。低 $O_2$ 中は、bFGFの存在下及び細胞分化、その後の中脳前駆細胞からマイトジェンが取り除かれた時には、BrdU標識指標は増大した(図2)。線条前駆細胞へのBrdU取り込み率は同様のパターンを示した。{エクспанション2日目：低 $O_2$ 中で $18 \pm 6\%$ 、対、 $20\%O_2$ 中で $11 \pm 6\%$  ( $n=24$ 、 $p < 0.05$ )。エクспанション6日目：低 $O_2$ 中で $30 \pm 8\%$ 、対、 $20\%O_2$ 中で $22 \pm 5\%$  ( $n=24$ 、 $p < 0.05$ )。分化4日目(in vitro 10日目)：低 $O_2$ 中で $12 \pm 5\%$ 、対、 $20\%O_2$ 中で $3 \pm 3\%$  ( $n=24$ 、 $p < 0.05$ )。}。

#### 【0099】

この明らかな低 $O_2$ 培養での細胞増殖の増加に加えて、前駆細胞は恐らく $20\%O_2$ 中で増殖したCNS前駆細胞よりも少ないアポトーシスを受けたであろう。中脳及び線条の両前駆細胞は、エクспанション時及びbFGF除去後の両方でTUNEL-陽性細胞の割合の顕著な低下を示した。中脳前駆細胞に関するTUNELデータを図3に示した。従って、減少したアポトーシス及び増大した細胞増殖の両方が、エクспанション終了時の細胞収量の上昇に寄与する。細胞死は、 $O_2$ レベルの低下により分化相時に減少するが完全に排除されるわけではない。

#### 【0100】

##### 細胞系列及びクローン増殖

低 $O_2$ 中の培養がいかに分化経路の選択及び分化の速度論に影響を及ぼすかを特徴付けるために、一連の分子マーカーを、形態学的評価と共に使用した。中間径フィラメントネスチンの免疫反応性を用いて、CNS幹細胞及び前駆細胞をより分化した子孫から区別した(Lendahlら、1990)。bFGF除去の6日後、エクспанションした前駆細胞に由来するネスチン-陽性細胞の割合は、低 $O_2$ 培養物で、 $20\%O_2$ 培養物と比べ著しく減少しており、このことは、分化が低 $O_2$ 中で加速されたことを示唆している(図4A及び図6)。提唱された明確なニューロン前駆細胞のマーカーであるNCAMのシアル酸置換型(PSA-NCAM) (Mayerら、1997)は、逆に、低 $O_2$ 中培養物の分化を低下した(図6)。より分化された表現型への進行が加速されるという考えは、低 $O_2$ 中でのニューロン性及びグリア性のマーカーのより早期の出現に

より裏付けられた。ニューロンは $\beta$ -チューブリンIII(Tuj1)染色により評価し、アストロサイトはグリア繊維酸性タンパク質(GFAP)で、オリゴデンドロサイト前駆細胞はO4で、及びオリゴデンドロサイトはGalCガラクトセレブロシド染色により評価した(図4)。bFGF除去の5日後、低O<sub>2</sub>中に維持された線条培養物は、46%のTuj1-陽性細胞を含んだのに対して、20%O<sub>2</sub>中では34%であり(n=12、p < 0.05)；GFAP+は6%であるのに対し、20%O<sub>2</sub>中では2%であり(n=12、p < 0.05)；かつ、Gal-C+は4%であるのに対し、20%O<sub>2</sub>中では5%であった(p=n. s.)。低酸素中に維持された中脳培養物においては、Tuj1+は73%であるのに対し、20%O<sub>2</sub>中では63%であり(n=12、p < 0.06)；GFAP+細胞はいずれの酸素条件でも検出されず；O4+は1%であるのに対し、20%O<sub>2</sub>中では0%であった(n=12、p < 0.01) (図4B)。

#### 【0101】

クローン密度に対するO<sub>2</sub>の作用を調べるために、中脳前駆細胞を最初にbFGF中20%O<sub>2</sub>中で6日間エクспанジョンし、密度が1~5個細胞/ウェルになるよう再度播種し、その後低又は20%O<sub>2</sub>中のいずれかで維持した。20日後、20ng/mL bFGFを取り除いた。典型的な多系分化反応を伴うクローン性培養物が、低O<sub>2</sub>及び20%O<sub>2</sub>条件の両方で観察された。図4Cは、典型的ネスチン+クローン(左パネル)及びマイトジェン除去後4日間ニューロン分化したクローン性に誘導された細胞(右パネル)を示している。予想される幹細胞のように、3種全ての系列は、低酸素条件で増殖したクローンで示された。しかし、クローン形成の効率は、低O<sub>2</sub>条件が3倍高く、平均クローンサイズも、20%O<sub>2</sub>中の<50個細胞より、低O<sub>2</sub>中の50~500個細胞と増加した(図4D、図4E)。

#### 【0102】

##### 実施例3

##### 結果：ニューロンサブタイプの分化

先の結果は、低酸素条件が幹細胞の増殖及びニューロン及びグリア細胞への分化を支持することを確立した。本発明者らの以前の研究は、ネスチン-陽性中脳前駆細胞が機能的ドーパミン作動性ニューロンへ分化することを示した(Studerら、1998)。次に、この特異的ニューロンの運命が低O<sub>2</sub>により影響を受けるかどうかを決定した。低酸素中での中脳前駆細胞は、THを発現しているニューロンの

絶対数及び画分の両方で際だった増加を示した(図5A、図5B)。低 $O_2$  中において、実質的には全てのニューロンがTH+であるような多くのニューロン細胞集塊が認められた。平均で、低 $O_2$  中で生成されたニューロン(Tuj1染色により印付け)の56%が、TH+であるのに対し、従来の培養物中では18%であった( $n=12$ 、 $p < 0.001$ )。低 $O_2$  培養物中で増大したTH-免疫反応性は、ウェスタンブロットにおける増大したTHタンパク質含量に相関していた(図5C)。更にTH-陽性ニューロンの機能的ドーパミン作動性の能力を逆相HPLCにより評価したところ、これは、低 $O_2$ 、対、20% $O_2$  培養物において顕著に増大したドーパミンレベルを示した(図5D)：馴化培地(condition medium) (24時間)は、5倍のドーパミンの増加を示した( $n=5$ 、 $p < 0.01$ )。HBSS中の基本的放出は、2~3倍の増加を示し( $n=5$ 、 $p < 0.05$ )、かつ放出の惹起は3倍の増加をもたらした( $n=5$ 、 $p < 0.05$ )。これらの結果は、機能的ドーパミン作動性ニューロンの分化には低酸素が好ましいことを確認している。

#### 【0103】

中脳前駆細胞は、ドーパミン作動性の運命に加えて、いくつかの異なる神経伝達物質表現型を伴うニューロンを生じる(Studerら、1998)。興味深いことに、セロトニン作動性ニューロンの割合も、20% $O_2$  中の $1.2 \pm 0.3\%$ に対し、低 $O_2$  中で $3.2 \pm 1.2\%$ と増大した( $n=12$ 、 $p < 0.05$ 、図6)。他方で、GABA+及びグルタミン酸+ニューロンは、低 $O_2$  中でより少ないように生じた(図6：GABA+細胞は、低 $O_2$  中で $6.6 \pm 1.8\%$ 、対、20% $O_2$  中で $10.4 \pm 1.5\%$ 、 $n=12$ 、 $p < 0.05$ ；グルタミン酸+細胞は、低 $O_2$  中で $12.8\% \pm 3.8\%$ 、対、20% $O_2$  中で $23.6 \pm 4.0\%$  ( $n=12$ 、 $p < 0.01$ )。GABAとTHの二重標識は検出されず、これはTHの免疫反応性が分化したドーパミン作動性ニューロンに対応しており、かつGABA作動性ニューロンの発生時に認められる一過性の発生的現象ではないことを示している(Maxら、1996)。更に、TH-陽性ニューロンは、ドーパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼで染色されなかったので、ノルアドレナリン作動性の表現型は運命づけられていない。

#### 【0104】

低 $O_2$  は、腹側(ventral)ニューロン表現型であるドーパミン作動性及びセロトニン作動性ニューロンの両方の分化を促進したので(Yamadaら、1991；Hynesら、1995；Yeら、1998)、これらの変化は、底板細胞の増加に関連していることが決

定された。免疫組織化学的に、低 $O_2$ 中でのFP4+細胞のエクспанジョンされたゾーンが明らかにされた(図6)。より際立った特徴は、低 $O_2$ 中で転写因子エングレイルド-1(En1) (*engrailed-1*)を発現しているニューロン出現の増大である(図6)。エングレイルド-1は、通常の中脳発生に重要であり(Joyner、1996; Danelian 及びMcMabon、1996; Wurstら、1994)、かつドーパミン作動性ニューロンの運命の制御に関連している(Simoneら、1998)。

#### 【0105】

低酸素条件が、培養システムの増殖又は分化相の間に作用することにより、ドーパミン作動性の分化を増強するかどうかを確立することは重要である。中脳前駆細胞を5日間、低又は20% $O_2$ 中のいずれかでエクспанジョンした。その後各群を低又は20% $O_2$ のいずれかでの分化について再分した。低 $O_2$ 中でエクспанジョンされたが20% $O_2$ 中で分化された前駆細胞は、 $38 \pm 6\%$ のTH-ニューロンを生じ、これは全て低 $O_2$ 中で維持されたもの( $41 \pm 7\%$ 、 $n=12$ 、 $p = n.s.$ )と類似していたが、全て20% $O_2$ 中で維持されたもの( $17 \pm 4\%$ 、 $n=12$ 、 $p < 0.01$ )よりも顕著に高かった。分化相に制限された低 $O_2$ への曝露は、全て20% $O_2$ 中で維持された培養物と比べて、ドーパミン作動性ニューロンの収量を顕著に増大することはなかった( $21 \pm 2\%$ 、 $n=12$ 、 $p=n.s.$ )。これらのデータから、低 $O_2$ の主な作用はエクспанジョンフェーズにおけるものであることが示された。

#### 【0106】

半一定量的RT-PCRを用いて、培養物のRNAを様々な時点で、ドーパミン作動性ニューロン発生に関与する候補遺伝子の示差的発現についてアッセイした(図7)。20% $O_2$ と比べて、THメッセージのわずかな増加が、分化後の低 $O_2$ 培養物から検出された。Ptx3ホメオボックス遺伝子も、ドーパミン作動性ニューロンの発生に関連していて(Smidtら、1997)、かつ低 $O_2$ 中での増大したレベルで発現し、このことはこれらの条件が、単純にTH遺伝子発現をアップレギュレーションしたのではなく、ドーパミン作動性表現型を促進したことを示唆している。強力な証拠は、ソニックヘッジホグ(*socnic hedgehog*)遺伝子(Echelardら、1993)；及び、Nurr1 (Saucedo -Cardenasら、1998)遺伝子を、中脳ドーパミン作動性ニューロンの分化に関連付けているが、発現の $O_2$ 一依存性は検出されなかった。しかし、エン



グレイルド-1は、低 $O_2$ 中でアップレギュレーションされ、これは免疫組織化学的結果と相似していた(図6)。繊維芽細胞成長因子8b(FGF8b)のメッセージは、エクспанションフェーズの終了時まで、低 $O_2$ 中で劇的にアップレギュレーションされる。ドーパミン作動性分化の他の調節因子に対するメッセージは、 $O_2$ 条件に著しく左右されることはなかった。

#### 【0107】

#### 実施例4

考察：低酸素培養はCNS幹細胞の増殖と生存に好都合である

哺乳動物細胞の培養の標準条件は、5% $CO_2$ と95%空気のガス雰囲気中で37℃である。即ち、環境温度は、コア哺乳動物体内温度を反映するように調節され、 $CO_2$ はほぼ静脈濃度を反映するように調節されるが、著しく対照的には、培養内 $O_2$ レベルは生理的レベルを反映するように調節されない。水面においては、加湿されていない室内空気は、21%の $O_2$ を含有し、95%空気/5% $CO_2$ 混合物は、20% $O_2$ を含有する。肺胞気は14%の $O_2$ を含有し、動脈 $O_2$ 濃度は12%であり、静脈 $O_2$ レベルは5.3%であり、組織細胞内 $O_2$ 平均濃度は3%である(Guyton, & Hall, 1996)。本研究に直接関係する成体ラット及びヒツジ胎児の脳平均 $O_2$ は、共に1.6%であった(Silver & Erecinska, 1988; Koos & Power, 1987)。脳領域の生理的組織 $O_2$ レベルは低い(表1)。本実験においては、CNS幹細胞培養に関する、より生理的な低酸素レベルの影響を分析し、4つの主な効果：1)前駆細胞の増殖増加；2)アポトーシスの減少；3)分化した状態への進行加速；4)TH+ニューロンの絶対数と割合の上昇がわかった。

#### 【0108】

低 $O_2$ 培養は、一貫してCNS幹細胞の増殖を促進させた。ほとんどの細胞がネスチン+前駆体であるときの増殖フェーズ中に細胞数の2~4倍の増加が観察された。この細胞数の増加は、増殖がかなり減少し分化が行われたときのマイトジェンの使用中止後にも維持された。低 $O_2$ において分化した培養中に多くの細胞が存在するが、ニューロンとグリアの割合は、2つの培養条件において同様であった。神経組織においては、特殊化されているが、視神経冠由来頸動脈体クロム親和性細胞において低 $O_2$ のマイトジェン活性の支持している先例がある(Nurse & Vollm

er, 1997)。これらのドーパミン作動性系球体細胞は、機能的に特殊化された $O_2$ 感受性化学受容体であるので、動脈における $O_2$ レベルの変化に特異的に応答すると考えられる。本結果から、低酸素がCNS幹細胞の増殖と生存を促進させることがわかる。

#### 【0109】

2つの特定のシグナリング経路、FGF8及びEP0は、低 $O_2$ 応答に重要な役割の候補として同定され、各々が20%の $O_2$ において低 $O_2$ 表現型の一部を反復し得ることがわかった。低 $O_2$ 培養によってエリスロポイエチンとFGF8をコードしているRNAの相対増加がもたらされた。初期の中脳発達においては、FGF8はマイトジェンとして機能する(Dandlian & McMahon 1996)が、CNS幹細胞培養物に対するFGF8の顕著なマイトジェン又は栄養効果は報告されていない。ここでは、20% $O_2$ 中で維持されかつ250 ng/mlのFGF8に曝露した中脳前駆体からの細胞収量の増加が、低 $O_2$ の増殖/栄養効果を部分的に再現し、低 $O_2$ 中の200～400%増加と比べて総数が30%増加した。増殖促進のほかに、低 $O_2$ 中で培養したCNS幹細胞においてアポトーシスが減少する。室内空気培養物中に生じた反応性酸素中間体(ROI)には毒性の潜在的役割がある。しかしながら、20% $O_2$ 培養が低 $O_2$ 培養より酸化ストレスを生じること、フリーラジカルが虚血状態で生じるので単純に考えることができない(Perez Velazquezら, 1997)。

低 $O_2$ に見られる細胞数の増加と対照的に、増殖した線条体前駆体又は中脳前駆体に由来するニューロンとアストログリアとオリゴデンドログリアの最終比に影響がわずかだけ検出された。クローナル分析と共にこの結果から、低酸素で増殖したネスチン+前駆体が幹細胞特性を有することが確認される。

#### 【0110】

##### 実施例5

考察：ドーパミン作動性コミットメント(commitment)と分化

CNS幹細胞が複数のニューロンタイプを生じ得る多くの証拠がある(Joheら, 1996; Grittiら, 1996; Kalyaniら, 1998)。ニューロンサブタイプ特定化のモデルとして中脳が数年研究されてきた(Hynesら, 1995; Yeら, 1998; Wangら, 1995; Ericsonら, 1995; Hynes & Rosenthalの総説, 1999)。最近、試験管内で中脳前

駆細胞を増殖し、ドーパミン作動性ニューロンに分化させる条件が確かめられた (Studerら, 1998)。わずか5%のニューロンがTHに免疫反応であるラット胎児中脳初代培養と対照的に、E12中脳から分離した前駆体培養においてはこの数字が24%のニューロンに上昇した。ここでは、中脳前駆体から生じた56%のニューロンがTH<sup>+</sup>であり、この知見はHPLCによりドーパミン生産増加と関連があることがわかる。この脳領域に見られる他の腹側ニューロンタイプのセロトニンニューロンも低O<sub>2</sub>で数の増加が生じた。対照的に、GABA作動性ニューロンとグルタミン酸作動性ニューロンの数は減少した。低酸素条件は、前駆細胞エクспанションフェーズでドーパミン作動性ニューロンを生成するのにたいいてい有効であった。これらの結果は、低酸素条件が分化前に作用するメカニズムによって腹側動態の生産を高めることを示している。

#### 【0111】

中脳ドーパミン作動性ニューロン発生の媒介物質と考えられているFGF8及びEn1の転写物レベル(Yeら, 1998; Simoneら, 1998; Shamimら, 1999)は、低O<sub>2</sub>培養と20%O<sub>2</sub>培養においてアップレギュレートした。FGF8は、セロトニンニューロンのコミットメントにも関与している(Yeら, 1998)。これらの知見は、低O<sub>2</sub>培養に見られるドーパミン作動性ニューロンサブタイプ及びセロトニンニューロンサブタイプのエクспанションにおけるFGF8の役割と一致している。しかしながら、20%O<sub>2</sub>培養へのFGF8の添加又は低O<sub>2</sub>培養におけるFGF8の中和は、O<sub>2</sub>依存性ニューロンサブタイプ分化パターンを再現しなかった。分泌したモルフォゲンソニックヘッジホッグ(sonic hedgehog) (SHH)は、初期神経プレートの体外移植組織においてドーパミン作動性ニューロン分化を誘導することがわかっている(Hynesら, 1995; Yeら, 1998; Wangら, 1995)。精製したソニックヘッジホッグは、両酸素条件下に増殖した中脳前駆体に対して効果がなかった。

#### 【0112】

Engrailed-1 mRNAとタンパク質レベルは、低酸素で上昇した。Engrailed-1は、pax2、wnt-1及びFGF8による経路に作用して中脳ニューロンの運命を調節すると考えられている(Joyner, 1996; Danelian & McMahon, 1996; Wurstら, 1994; Simoneら, 1998)。FGF8遺伝子は、Engrailedの結合部位を含んでいる(Gemelら,

1999)。更に、FGF8 5'-UTR配列(受託番号#AF065607)は、VEGF及びEPO調節要素における酸素応答性を制御することが既知である9塩基配列(CCTCCCTCA)を含んでいる(Scandurro, & Beckman, 1998)。本発明者らは、En1が低O<sub>2</sub>培養においてFGF8の直接の上流調節遺伝子として作用するのか又はそれぞれが独立して作用するかをまだ決定していない。しかし、若いニューロンにおけるEn1の目だった発現は、ニューロンサブタイプ分化を調節する良好な候補であってもよいことを示している。

#### 【0113】

EPOレベルは、造血系において酸素によって調節されることが既知である。EPO及びその受容体は、初期発生から成体期まで脳において発現する(Juulら, 1999)が、CNS発達のEPOの特定の役割は記載されていない。しかしながら、成体CNSにおいて、EPOは神経保護物質として注目され(Sakanakaら, 1998)、PC12細胞のEPO処理は、細胞内モノアミンレベルを上昇させることが証明されている(Masudaら, 1993)。ここでの結果から、20%O<sub>2</sub>においてEPOが低O<sub>2</sub>効果の一部をミミックし得ることがわかる。20%O<sub>2</sub>培養におけるドーパミン作動性ニューロンの収量の増加は用量依存性であるが、収量の増加は低酸素におけるEPOによって仲介されず、低O<sub>2</sub>におけるEPOレベルはこの応答の最大機能レベルにあったことを示している。20%O<sub>2</sub>培養のEPO補足は、ドーパミン作動性収量を著しく向上させるが、低O<sub>2</sub>の十分な効果は再現されず、低O<sub>2</sub>においてドーパミン作動性分化を促進させるのに追加の要因が関係していることを示している。しかし、EPOがエクспанジョンしたCNS前駆体の分化パターンに影響するという知見は新規であり、低酸素条件におけるドーパミン作動性ニューロン収量増加の成分としてのEPOを明らかにしたものである。

#### 【0114】

分化したドーパミン作動性中脳ニューロンを低酸素条件(0%のO<sub>2</sub>ガス混合物)に曝露するとドーパミン含量が増加することが最近の報告によって強調された(Grossら, 1999)。他の研究によって、5%O<sub>2</sub>に曝露した後のE14ラットからのニューロン初代培養においてTH発現ニューロンの相対増加が記載されている(Coltonら, 1995)。また、低酸素条件がTH遺伝子の発現を援助することも既知である(Cz

zyk-Krzeskaら, 1994; Pauliding, & Czyzyk-Krzeska, 1999)。しかしながら、これは、低酸素条件がエクспанジョンフェーズでCNS幹細胞を支持しかつ腹側ニューロンサブタイプの生産を高める最初の報告である。

20%O<sub>2</sub> と比べて低O<sub>2</sub> におけるドーパミン作動性ニューロンの正味増殖は、少なくとも9倍促進した(全細胞数で3倍の増加、及びTH+ニューロンのパーセンテージで3倍の増加)。HPLCから、これらのニューロンがドーパミンを生産することがわかる。本結果から、培養において従来用いられているものより非常に低い酸素レベルがin vivoの現象を模倣するのに用いることができることがわかる。低O<sub>2</sub> 培養は、パーキンソン病の移植片治療のためのドーパミン作動性ニューロンの効率のよい生産にあずかるという実用的意味を有する。最後に、細胞培養に対する生理的低O<sub>2</sub> の効果は、CNSに限定されず、PNS及び他のニューロン組織に及ぶものである。

#### 【0115】

ドーパミン作動性分化に対するEP0の影響が研究された。飽和濃度のEP0又はEP0中和抗体を、実施例3に示された条件を用いて低O<sub>2</sub> 又は20%O<sub>2</sub> で増殖フェーズと分化フェーズの間(それぞれ5日間)にE12中脳前駆体培養に添加した。EP0を、播種時またはbFGFを除いたときの開始時に5 U/mlの用量で5日間培養液に添加した。総培養時間10日間の終わりに、細胞を固定し、THを染色してドーパミン作動性ニューロンをマークした。ポジティブ染色細胞の数を計数した。EP0補足によって、20%O<sub>2</sub> 培養内のTH+細胞数が著しく増加した(n=6、p<0.05)。

EP0の代わりに抗EP0で実験を繰り返した。抗EP0濃度は、飽和濃度にした。時間は、EP0実験と同じにし、染色し、同じ10日の時点で計数した。EP0中和抗体によって、低酸素(n=6、p<0.05)培養と20%O<sub>2</sub> 培養双方においてTH+細胞数が減少した。図8は、EP0が初期に添加された場合の結果を示す図である。EP0の後期添加において同様の結果が得られた。

#### 【0116】

本明細書に開示され特許を請求した組成物及び/又は方法のすべてが、本開示によって過度の実験をすることなく実施し得る。本発明の組成物及び方法は好適実施態様によって記載してきたが、本発明の概念、真意及び範囲から逸脱するこ



となく本明細書に記載された組成物及び/又は方法及び方法の工程又は工程の順序に変更を加えることができることは当業者に明らかである。更に詳しくは、本明細書に記載された薬剤を化学的及び生理的双方に関係するある種薬剤に置き換えることができ、同じ又は似た結果が得られることは明らかである。当業者に明らかな類似した代用及び変更はすべて、前述の特許請求の範囲によって定義された本明細書の真意、範囲及び概念の範囲内と考えられる。

# 【0117】

## 参考文献

以下の参考文献は本明細書に述べた方例示的または他の詳細な記載の補足的記載を提供するものであり、本明細書に引用により取り込まれるものとする。

Bjorklund and Stenevi, Intracerebral neural grafting in animal models of aging brain: strategies, rationale and preliminary results. Dan Med Bull. 32 Suppl 1:35-9 (1985).

Bjorklund, Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery, Curr Opin Neurobiol. 2(5):683-9 (1992)

Bosio et al., Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:13280-13285, 1996.

Bowenkamp et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. J Comp Neurol.;355(4):479-89 (1995).

Chen and Okayama, High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA," Mol. Cell Biol., 7:2745-2752, (1987)

Chen et al., The effect of prior in vitro exposure of donor cells to trophic factors in neuro transplantation. Exp. Neurol., 138:64-72. (1996).

Colton et al., Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. Exper. Neurol. 132, 54-61 (1995).

Cornelison & Wold, "Single-Cell analysis of Regulatory Gene Expression i

n Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells," *Developmental Biology*, 191:270-283, (1997).

Czyzyk-Krzeska et al., Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Biol. Chem.* 269, 760-764 (1994).

Danielian, P.S., McMahon, A.P. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signaling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 383, 332-334 (1996).

Dunnett and Bjorkland., in *Functional Neural Transplantation, Advances in Neuroscience, Volume 2*, Raven Press, New York (1994)

Echelard et al., Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430, (1993).

Engel and Bohn, The neurotrophic effects of fibroblast growth factor on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J. Neurosci.*, 11:3070-3078 (1991).

Ericson et al., Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747-756 (1995).

Fraley et al., "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, (1979).

Freeman et al., The USF protocol for fetal nigral transplantation in Parkinson's disease *Experimental Neurology*, 129:6-7(1994).

Gash et al., Functional recovery in Parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380:252-255. (1996).

Gemel et al., Fibroblast growth factor-8 expression is regulated by interonic engrailed and Pbx1-binding sites. *J. Biol. Chem.* 274, 6020-6026 (1999).

Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures," *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, (1985).

Graham and van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology*, 52:456-467, (1973).

Gritti et al., Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16, 1091-1100 (1996).

Gross et al. Hypoxia during early developmental period induces long-term changes in the dopamine content and release in a mesencephalic cell culture. *Neuroscience* 92, 699-704 (1999).

Gundersen et al., Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 379-394 (1988).

Guyton and Hall, "Transport of oxygen and carbon dioxide in the blood and body fluids," In: *Textbook of Medical Physiology*, WB Saunders Co., Philadelphia, 1996, pp. 513-523.

Harland and Weintraub, "Translation of mammalian mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA," *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, (1985).

Hazel & Muller, "Culture of Neuroepithelial Stem Cells," *Current Protocols in Neuroscience*, 3.1.1-3.1.6, (1997).

Hoffman et al., "Comparison of the effect of etomidate and desflurane on brain tissue gases and pH during prolonged middle cerebral artery occlusion." *Anesthesiology* 88, 1198-1194, 1998.

Hyman et al., BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 350:230-232 (1991).

Hynes and Rosenthal, Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 26-36 (1999).

Hynes et al., Control of neuronal diversity by the floor plate: Contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* 80, 95-101 (1995).

Isacson et al., Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:2728-2732 (1986).

Johe et al., Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10, 3129-3140 (1996).

Joyner, A.L. Engrailed, Wnt, and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* 12, 15-20 (1996).

Juul et al., Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2, 148-158 (1999).

Kalyani et al., Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci.* 18, 1856-1868 (1998).

Kang et al., Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(23):13788-13793, 1998.

Knusel et al., Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.*, 10:558-567. ., (1990).

Knusel et al., Promotion of cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:961-965(1991).

Kocher et al., Identification of a novel gene, selectively up-regulated in human carcinomas, using the differential display technique. *Clin. Cancer Res.*, 1(10):1209-1215, (1995).

Koos and Power, Predict fetal brain P02 during hypoxaemia and anemia in

- sheep. J. Develop. Physiol. 9, 517-726 (1987).
- Lendahl et al., CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60, 585-595 (1990).
- Lindvall et al., Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. Science, 247:574-577(1990).
- Martinez-Serrano et al. CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult brain: complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. J. Neurosci., 15:5668-5680(1996).
- Masuda et al., Functional erythropoietin receptors of the cells with neural characteristics Comparison with receptor properties of erythroid cells. J. Biol. Chem. 268, 11208-11216 (1993).
- Max et al., Co-expression of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in dopamine differentiation factor-treated striatal neurons in culture. Dev. Brain Res. 91, 140-142 (1996).
- Maxwell et al., The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399, 271-275 (1999).
- Mayer et al., Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons-I. Effects in vitro. Neuroscience, 56:379-388 (1993a).
- Mayer et al., Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons-II. Effects on nigral transplants in vivo. Neurosci., 56:389-398, (1993b).
- Mayer-Proschel et al., Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. Neuron 19, 773-785 (1997).
- McKay, R.D. Stem cells in the central nervous system. Science 276, 66-71 (1997).

Moreau et al., Regulation of c-ret expression by retinoic acid in rat metanephros: implication in nephron mass control. *Am. J. Physiol.* 44, F938-F945 (1998).

Neelakanta & Csete, "Efforts to overcome the liver donor shortage," *Chirurgia Internat.*, 1996.

Neural Grafting in the Mammalian CNS, Bjorklund and Stenevi, eds., 1985  
Das, Ch. 3 pp. 23-30; Freed, Ch. 4, pp. 31-40; Stenevi et al., Ch. 5, pp. 41-50; Brundin et al., Ch. 6, pp. 51-60; David et al., Ch. 7, pp. 61-70; Seiger, Ch. 8, pp. 71-77, 1985

Nicolau and Sene, Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, (1982).

Nikkhah et al., Platelet-derived growth factor promotes survival of rat and human mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Exp. Brain Res.*, 92:516-523 (1993).

Nurse and Vollmer, Role of basic FGF and oxygen in control of proliferation, survival, and neuronal differentiation in carotid body chromaffin cells. *Dev. Biol.* 184, 197-206 (1997).

Olanow et al., Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 19, 102-109 (1996).

Olson Toward trophic treatment in parkinsonism: a primate step. *Nature Med.*, 2:400-401(1996).

O'Rourke et al., "Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone," *Development* 124:997-1005, (1997).

Othberg et al., Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on embryonic rat and human DA neurons in vitro. *Exp. Brain Res.*, 105:111-122 (1995).

Panchinsion et al., Plasticity and stem cells in the vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 727-733 (1998).

Paulding and Czyzyk-Krzeska, Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA sta



bility by protein binding, pyrimidine-rich sequence in the 3' untranslated region. J. Biol. Chem. 274, 2532-2538 (1999).

Perez Velazquez et al., In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. J. Neurosci. 17, 9085-9094 (1997).

Potter et al., Enhancer-dependent expression of human immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation, Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.

Poulsen et al., TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. Neuron, 13:1245(1994).

Rippe et al., DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture, Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.

Rosenblad. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts. J. Neurosci. 16:979-985 (1996).

Rutka et al., Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review J Neurosurg.;87(3):420-30, (1997).

Sakanaka, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 4635-4640 (1998).

Sanberg et al., Cell transplantation for Huntington's disease R.G. Landers Co., Boca Raton, Fla., pp. 19-21, (1994).

Saucedo-Cardenas et al., Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 4013-4018, (1998).

Sauer et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor  $\beta$ 3 prevents delayed degeneration of nigral DA neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8935-8939(1994).

- Scandurro and Beckman, Common proteins bind mRNAs encoding erythropoietin, tyrosine hydroxylase, and vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246, 436-440 (1998).
- Schmidt et al., Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [14C]2-deoxy-D-glucose autoradiography *J. Neurochem.* 38:737-748, (1982).
- Shamim et al., Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain. *Development* 126, 945-959 (1999).
- Silver and Erecinska, Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. In *Oxygen Transport to Tissue XX*, 7-15, edited by Hudetz and Bruley, Plenum Press, New York (1988).
- Simone et al., En-1 and En-2 control the fate of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmentum. *Eur. J. Neurosci.* 10, 389-399 (1998).
- Smidt et al., A homeodomain gene Ptx 3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 13305-13310, (1997).
- Stenevi et al., Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival, *Brain Res.* 114:1-20 (1976)
- Studer et al., Non-invasive dopamine determination by reversed phase HPLC in the medium of free-floating roller tube cultures of rat fetal ventral mesencephalon. A tool to assess dopaminergic tissue prior to grafting. *Brain Res. Bull.* 41, 143-150 (1996).
- Studer et al., Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature Neurosci.* 1, 290-295 (1998).
- Tur-Kaspa et al., Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes, *Mol. Cell Biol.* 6:716-718,

1986.

U. S. Patent 5,082,670

U. S. Patent 5650148

U. S. Patent 5762926

U. S. Patent 4,683,195

U. S. Patent 4,800,159

U. S. Patent 4,861,719

U. S. Patent 4,886,741

U. S. Patent 4,888,278

U. S. Patent 5,019,034

U. S. Patent 5,120,657

U. S. Patent 5,139,941

U. S. Patent 5,225,326

U. S. Patent 5,252,479

U. S. Patent 5,328,688

U. S. Patent 5,364,790

U. S. Patent 5,474,935

U. S. Patent 5,506,098

U. S. Patent 5,507,724

U. S. Patent 5,521,061

U. S. Patent 5,538,869

U. S. Patent 5,585,362

U. S. Patent 5,612,205

U. S. Patent 5,612,205

U. S. Patent 5,620,689

U. S. Patent 5,622,856

U. S. Patent 5,631,018

U. S. Patent 5,658,776

U. S. Patent 5,661,025

U. S. Patent 5,661,033  
U. S. Patent 5,665,540  
U. S. Patent 5,670,488  
U. S. Patent 5,686,278  
U. S. Patent 5,693,509  
U. S. Patent 5,707,618  
U. S. Patent 5,714,166  
U. S. Patent 5,721,367  
U. S. Patent 5,749,847  
U. S. Patent 5,750,376  
U. S. Patent 5,770,414  
U. S. Patent 5,773,289  
U. S. Patent 5,785,987  
U. S. Patent 5,789,213  
U. S. Patent 5,789,215  
U. S. Patent 5,789,390  
U. S. Patent 5,795,581  
U. S. Patent 5,800,992  
U. S. Patent 5,824,544  
U. S. Patent 5,824,547  
U. S. Patent 5,827,703  
U. S. Patent 5,830,698  
U. S. Patent 5,830,725  
U. S. Patent 5,830,727  
U. S. Patent 5,834,181  
U. S. Patent 5,834,441  
U. S. Patent 5,836,905  
U. S. Patent 5,849,571  
U. S. Patent 5,851,521

- U. S. Patent 5,851,818
- U. S. Patent 5,855,910
- U. S. Patent 5,856,152
- U. S. Patent 5,861,314
- U. S. Patent 5,863,541
- U. S. Patent 5,869,326
- U. S. Patent 5,879,934
- U. S. Patent 5,888,502
- Ungerstedt and Arbuthnott, Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485-493, (1970).
- Wang et al., Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nature Med.* 1, 1184-1188 (1995).
- Wictorin et al., Reformation of long axon pathways in adult rat CNS by human forebrain neuroblasts. *Nature*, 347:556-558 (1990).
- Wu and Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells in vitro," *Biochemistry*, 27:887-892, (1988).
- Wu and Wu, Receptor-mediated in vitro gene transfections by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, (1987).
- Wurst et al., Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: An early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120, 2065-2075 (1994).
- Yamada et al., Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647, (1991).
- Yang et al., "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.
- Ye et al., FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic ce

II fate in the anterior neural plate. Cell 93, 755-766 (1998).  
 Yoshimoto et al., Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. Brain Res., 691:25-36, (1995).

【配列表】

SEQUENCE LISTING		
5	<110> Csete, Marie Doyle, John Wold, Barbara J. McKay, Ron Studer, Lorenz	
10	<120> Low Oxygen Culturing of Central Nervous System Progenitor Cells	
	<130> 8597-18	
15	<140> unknown <141> 1999-11-18	
	<150> 09/195,569 <151> 1998-11-18	
20	<160> 24	
	<170> PatentIn Ver. 2.0	
25	<210> 1 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
30	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for GAPDH	
35	<400> 1 ctcgtctcat agacaagatg gtgaag	26
40	<210> 2 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for GAPDH	
45	<400> 2 agactccacg acatactcag cacc	24
50	<210> 3 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
55	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for VHL	
	<400> 3 cctctcaggt catcttctgc aacc	24



—66—

	<400> 8	
	agcggcttgg gtggcgtctg ga	22
5	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for VEGF	
15	<400> 9	
	gtgcactgga ccctggcttt act	23
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> DNA	
20	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for VEGF	
25	<400> 10	
	cgccttgcaa cgcgagtctg tggt	24
30	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for Nurrl	
40	<400> 11	
	tgaagagagc ggagaaggag atc	23
	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for Nurrl	
50	<400> 12	
	tctggagtta agaaatcgga gctg	24
55	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR	

	primer for Ptx3	
5	<400> 13 cgtgcgtggt tggttcaaga ac	22
	<210> 14 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
10	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for Ptx3H	
15	<400> 14 gcggtgagaa tacaggltgt gaag	24
20	<210> 15 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
25	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for SHH	
30	<400> 15 ggaagatcac aagaaactcc gaac	24
	<210> 16 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
35	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for SHH	
40	<400> 16 ggatgcgagc tttggattca tag	23
45	<210> 17 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
50	<220> <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for FGFB	
55	<400> 17 catgtgaggg accagagcc	19
	<210> 18 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR		
	primer for FGF8		
5	<400> 18		
	gtagttgttc tccagcagga tc		22
	<210> 19		
	<211> 23		
10	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR		
15	primer for En1		
	<400> 19		
	tcaagactga ctacagcaac ccc		23
20	<210> 20		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
25	<220>		
	<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR		
	primer for En1		
30	<400> 20		
	ctttgtctg aaccgtggtg gtag		24
	<210> 21		
	<211> 22		
	<212> DNA		
35	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR		
40	primer for FGFR3		
	<400> 21		
	atcctcggga gatgacgaag ac		22
45	<210> 22		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
50	<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR		
	primer for FGFR3		
	<400> 22		
55	ggatgctgcc aaacttggtc tc		22
	<210> 23		
	<211> 21		
	<212> DNA		

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
5	<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for BDNF	
	<400> 23	
	gtgacagtat tagcgagtgg g	21
10	<210> 24	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for BDNF	
	<400> 24	
20	gggtagttcg gcattgc	17

### 【図面の簡単な説明】

以下の図面は本明細書の部分を構成し、本発明の特徴をさらに明らかにするために含まれる。本発明は、本明細書に提示された個々の実施態様の詳細な説明とともにこれら図面の1つまたは2つ以上を参照してよりいっそう理解されるであろう。

【図1】 図1は、種々のプレート培養密度でのin vitro前駆細胞収量に対する低酸素の効果を示す。線条体培養を低酸素および周囲酸素中でbFGFでエクспанジョンし、増殖5日後に95%を越える細胞がネスチン+前駆細胞であるとき総細胞数を判定した。周囲酸素と比較して、顕著な細胞数の増加が低酸素で全ての密度で検出された。

【図2】 図2は、低酸素培養はCNS前駆細胞の増殖増加をもたらすことを示す。図2A：中脳前駆細胞を固定直前に60分間10 $\mu$ MのBrdUでパルス処理し、続いてBrdU取り込みについて染色した。より多くのBrdU+細胞が増殖時および分化時の両方で低酸素培養で観察された。縮尺棒=20 $\mu$ m。図2B：低酸素では中脳前駆細胞は、20%O<sub>2</sub>で維持した培養よりもBrdU+細胞の百分率の増加およびBrdU+細胞の絶対数の増加を生じる。データは平均値±SEMとして示され、n=40である。低酸素と20%酸素との間の相違は全ての時点および全てのパラメーター（エクспанジョン4日目のBrdU+細胞の割合を除く；n=8、p=0.10）で統計的に有意であった。

【図3】 図3は、低酸素で培養したCNS前駆細胞は（20%酸素に対して）アポトーシスの割合が減少することを示す。図3A：低酸素または20%酸素

で平行して培養した中脳前駆細胞をTUNEL標識してアポトーシスをアッセイした。エクспанジョン相（培養2日および6日）および分化相（bFGF除去後4日）の代表的な数値を示す。縮尺棒＝20  $\mu$ m。3B：低酸素で成育させた前駆細胞は、従来の培養と比較して顕著なアポトーシス細胞の百分率の低下を示した（ $n=8$ ,  $p<0.05$ ）。

【図4】 低酸素および20%酸素培養でのCNS幹細胞の基本的分化パターンを示す。図4A：前駆細胞由来ニューロン（TUJ1染色による）、星状神経膠細胞（GFAP）および稀突起神経膠細胞（Gal-C）の相対百分率について、低酸素または20%酸素中での線条体培養を5日間のbFGF増殖とそれに続く4日間の細胞分化後に調べた（定量については本文を参照されたい）。図4B：低酸素および20%酸素培養でのCNS幹細胞の基本的分化パターンを示す。低酸素または20%酸素で継代中脳前駆細胞を6日間増殖させ、さらに5日間分化させて、稀突起神経膠細胞の前駆細胞のマーカーであるO4について分析した。O4+細胞は低酸素培養でのみ検出できた。図4C：低酸素および20%酸素培養でのCNS幹細胞の基本的分化パターンを示す。ネスチン+クロンは、継代中脳前駆細胞の単一細胞から20日間のbFGF増殖の後で得られた（左図）。低酸素中のクロンは、bFGF除去に際してTUJ1+ニューロンに分化した（右図）。図4D：低酸素および20%酸素培養でのCNS幹細胞の基本的分化パターンを示す。低酸素はクロン形成を効率的に促進する。単一前駆細胞に由来するクロンの収量は、20%酸素培養と比較して低酸素培養で3倍高かった（左図）。低酸素培養の前駆細胞に由来するクロンの大半は50-500細胞を含み、一方、20%酸素培養のクロンサイズは一般に5-50細胞であった（右図）。縮尺棒＝20  $\mu$ m（全図）。

【図5】 図5は低酸素培養は機能的な前駆細胞由来ドーパミン作動性ニューロンの収量を改善することを示す。図5Aおよび図5B：E12中脳からの前駆細胞をbFGFで5日間増殖させ、続いて5日間分化させた。その後ニューロンマーカーTUJ1についてさらにTHについて染色した。TH+ニューロン総数（および%）の顕著な増加が、20%酸素培養と比較して低酸素培養で認められた（ $p<0.001$ ）。縮尺棒＝20  $\mu$ m。図5C：ウェスタンブロット分析によるTHタンパ



ク質レベルの定量で、低酸素培養から得たサンプルでは20%酸素培養に比してTHが顕著に多いことが分かった。各レーンに総タンパク質 $2.5\text{m}\mu\text{g}$ をロードした。図5D：電気化学的検出を装備したrp-HPLCを用いて、条件付け培養液（24時間）、15分条件付け処理後HBSS（基準放出）、および15分処理後にHBSS+56mMKCl（誘起放出）でのドーパミンレベルを定量した。低酸素で維持した培養では、これら全ての条件で20%酸素で成育させた場合と比較して顕著に多いドーパミンが検出された（条件付け培養液 $p<0.01$ ；基準および喚起放出 $p<0.05$ ）。挿入図は、低酸素および20%酸素培養でのドーパミン検出について典型的なクロマトグラフィー図を示している。

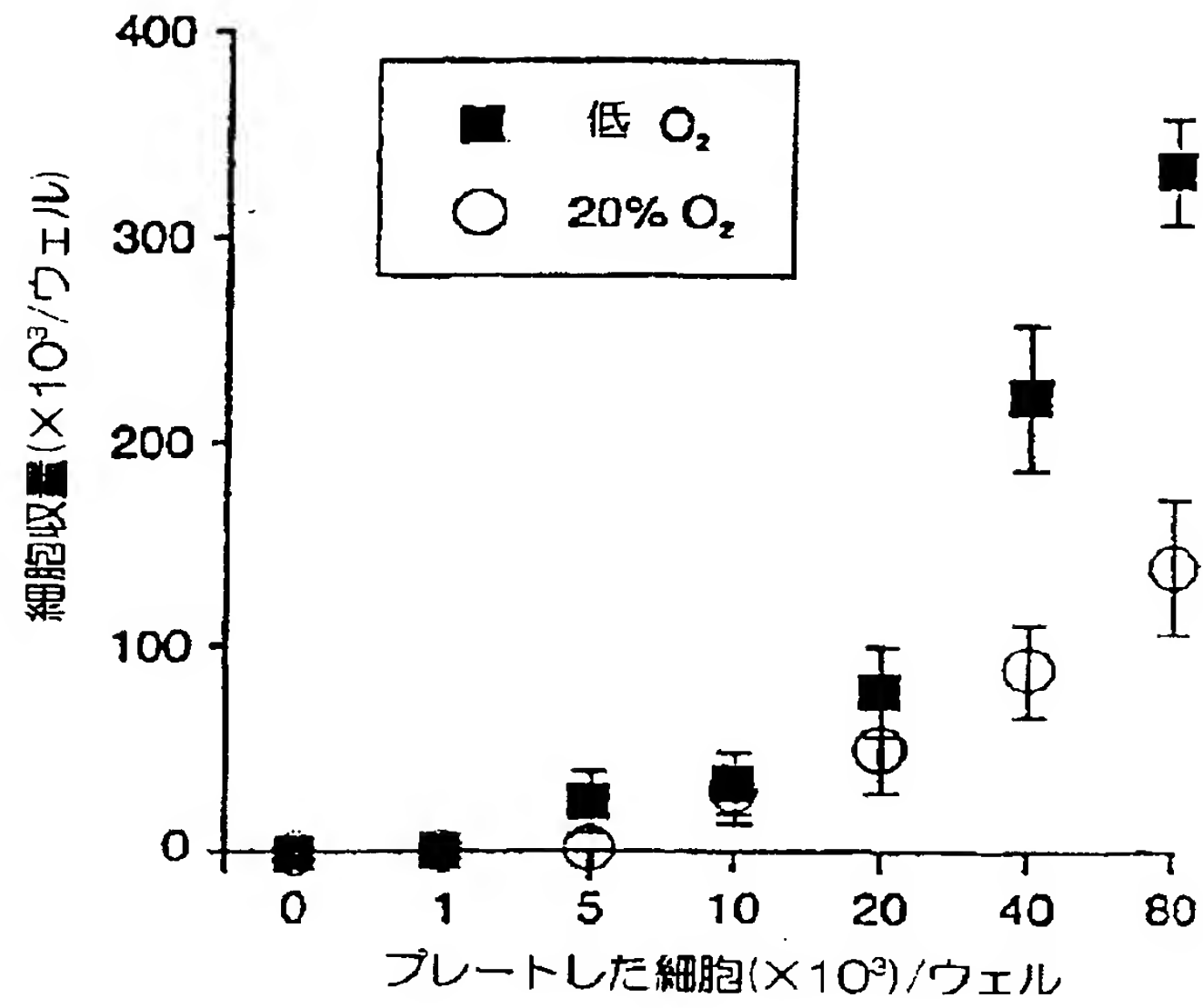
【図6】 図6は、低酸素培養と20%酸素培養における中脳前駆細胞からのニューロンサブタイプ分化を示す。二重免疫細胞化学標識によって、低酸素培養はドーパミン作動性およびセロトニン作動性ニューロン（Tuj1+）サブタイプの出現を顕著に増加させるが、GABA+およびグルタミン酸+ニューロンの出現を減少させることが明らかにされた。20%酸素培養でGABA染色で表示されたコロニーは、これらの状態での非常に高いGABA発現の通常でない例である。THおよびGABAは、いくつかの発生中ニューロンでin vivoで認められるように同時に発現されることはなかった。フロアプレート細胞（floor plate cell）（FP4+）は、中脳転写因子En1を発現しているニューロンの百分率と同様に低酸素培養でより多かった。20%酸素状態（下方右図）と比較して、前駆細胞マーカーネスチンおよびPSA-NCAMは両方とも低酸素培養で分化後に減少した。縮尺棒= $20\mu\text{m}$ 。

【図7】 図7は、低酸素および20%酸素培養での中脳前駆細胞における示差的遺伝子発現のRT-PCRによる評価を示す。図7A：酸素レベル変化に対する生理的反応に必要な遺伝子の発現を示す。HIF1 $\alpha$ 、VHL、EP0およびVEGFの発現を、低酸素および20%酸素で2または6日間のエクспанション後および分化後（分化第4日＝培養第10日）に判定した。データはGAPDH発現に対して標準化した。20%酸素に比して、顕著なEP0発現の増加がほとんどの細胞分化時に低酸素培養で検出され、一方、VEGF発現はエクспанションおよび分化の両方でアップレギュレートされた。驚くべきことには、HIF1 $\alpha$

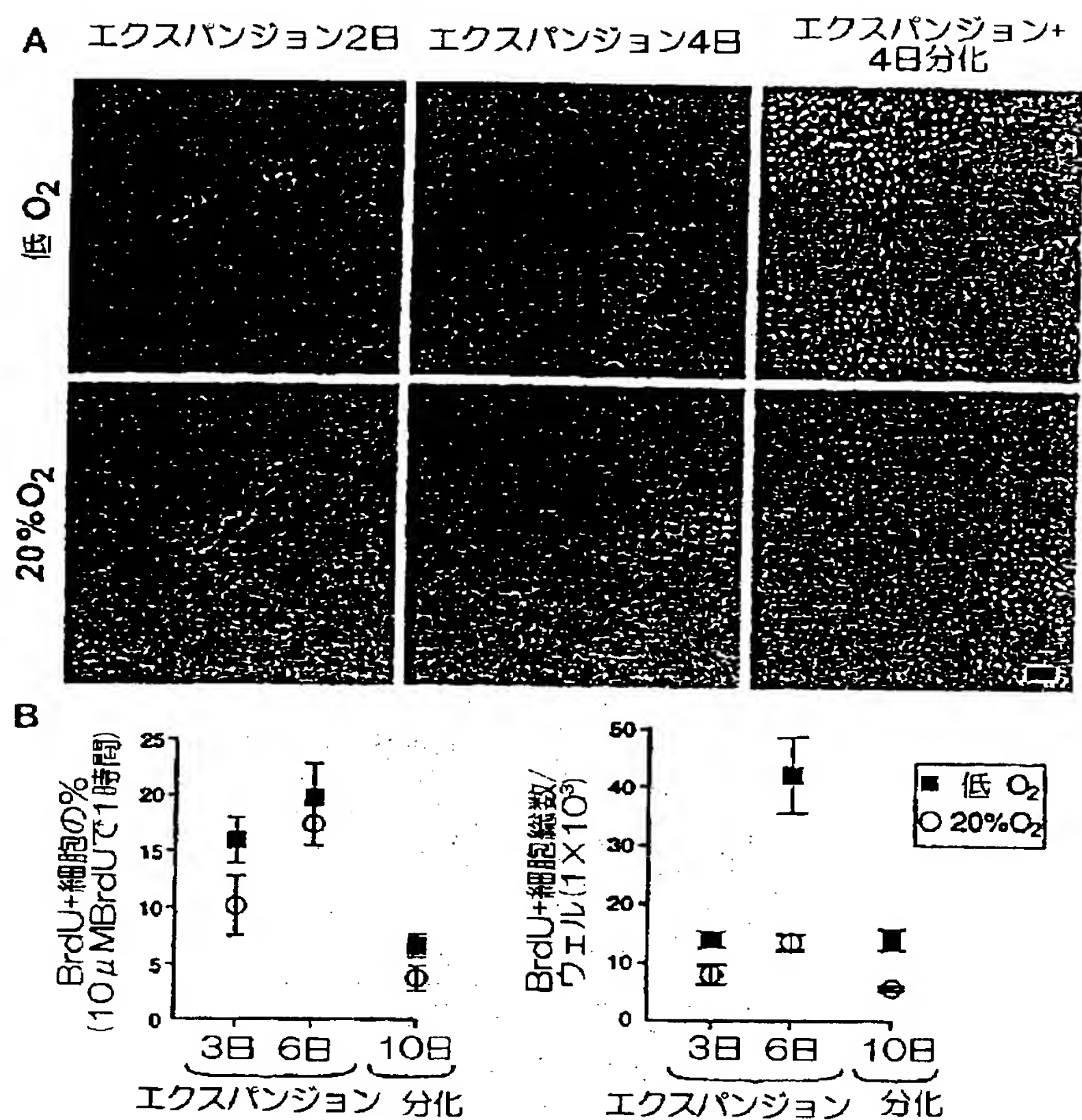
またはVHLの主要な酸素依存調節は認められなかった。図7B：中脳発生に必要な候補遺伝子もまた酸素依存性分化発現について調べられた。細胞分化中のTHおよびPtx-3の発現増加によって、低酸素培養における多数の機能的ドーパミン作動性ニューロンの存在が確認された（図5と比較されたい）。FGF8およびEn1の発現レベルにおける酸素仲介変化の顕著な低下もまた検出された。

【図8】 図8は、EP0はドーパミン作動性分化に対する低酸素の効果と類似することを示す。飽和濃度のEP0またはEP0中和抗体を、低酸素または20%酸素で増殖相および分化相の両方のE12中脳前駆細胞培養に（それぞれ5日間）加えた。EP0の補充は、20%酸素培養でTH+細胞の数を顕著に増加させた(n=6、 $p<0.05$ )。EP0中和抗体は、低酸素(n=6、 $p<0.01$ )および20%酸素培養(n=6、 $p<0.05$ )の両方でTH+細胞数を減少させた。縮尺棒=20  $\mu\text{m}$ 。

【図1】

**FIGURE 1**

【図2】

**FIGURE 2**

【図3】

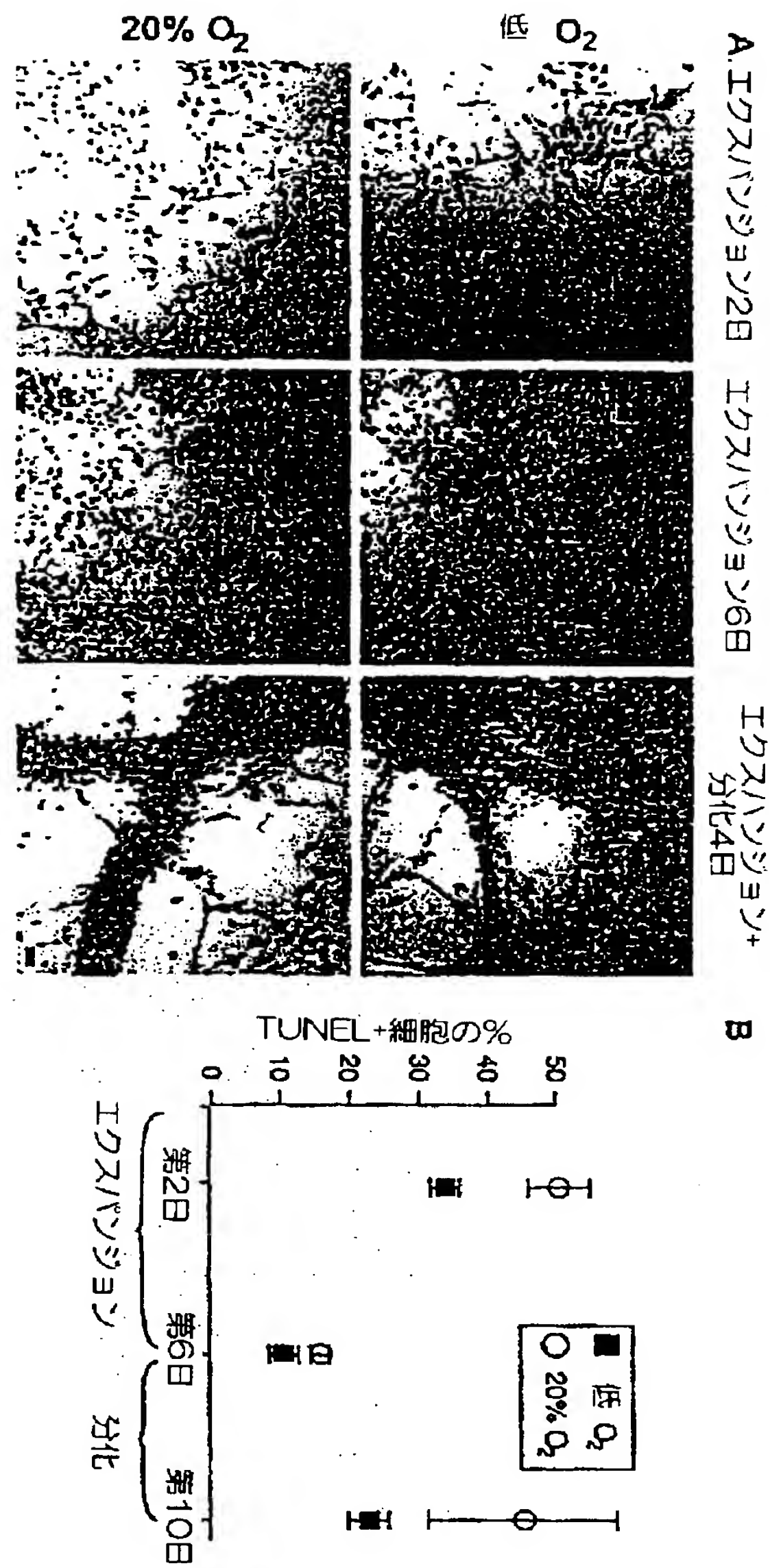


FIGURE 3

【図4】

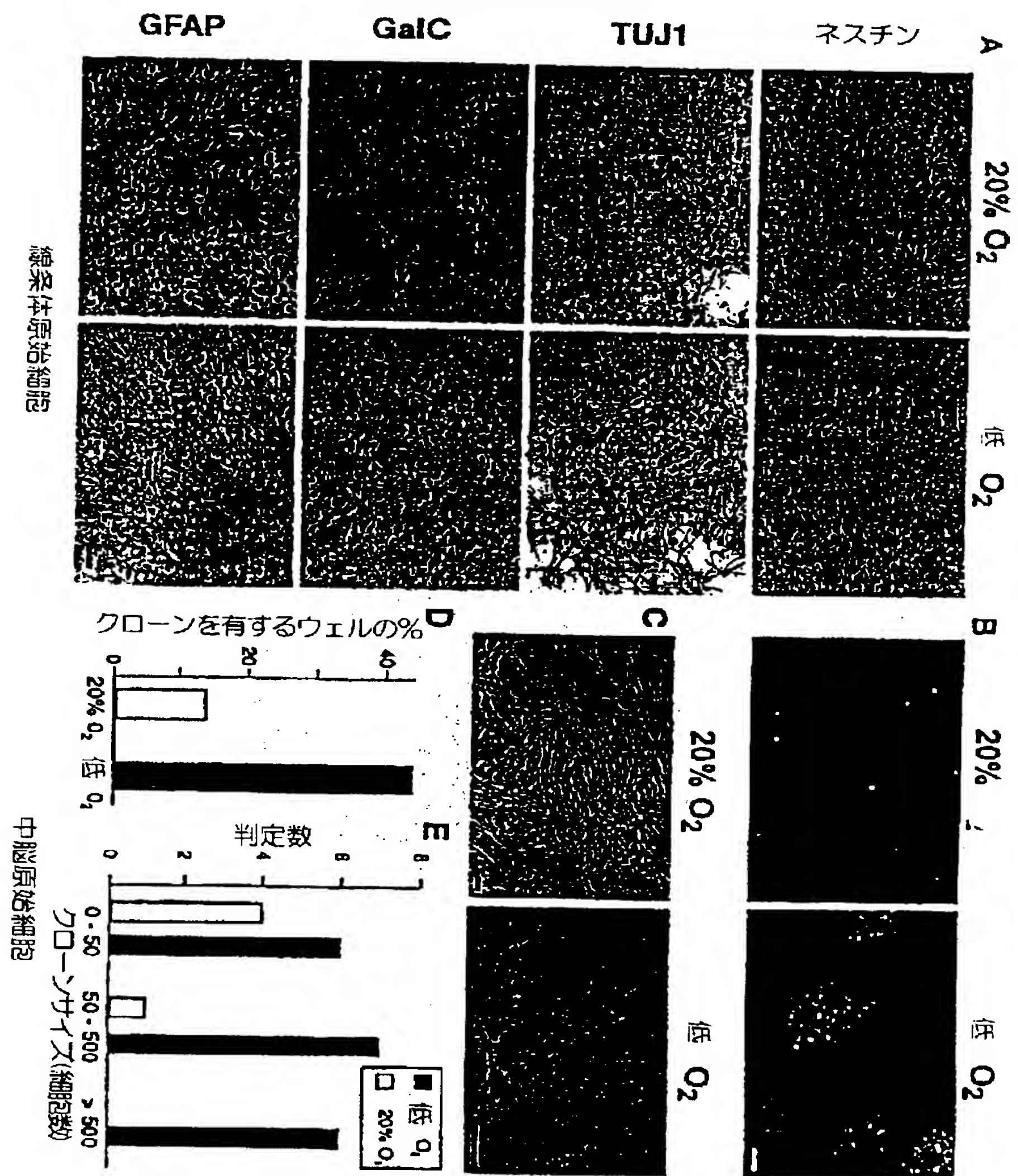


FIGURE 4



【図5】

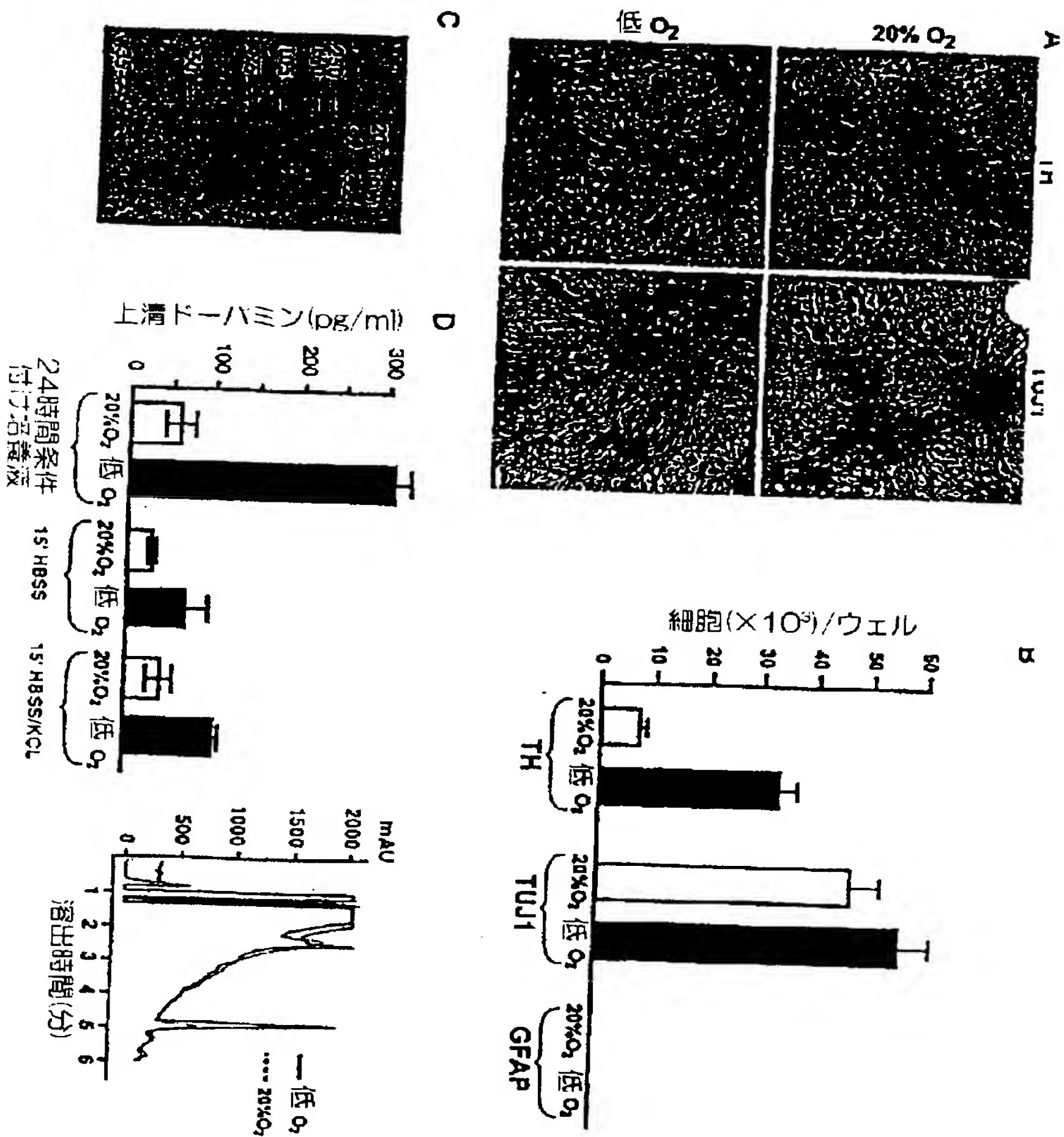
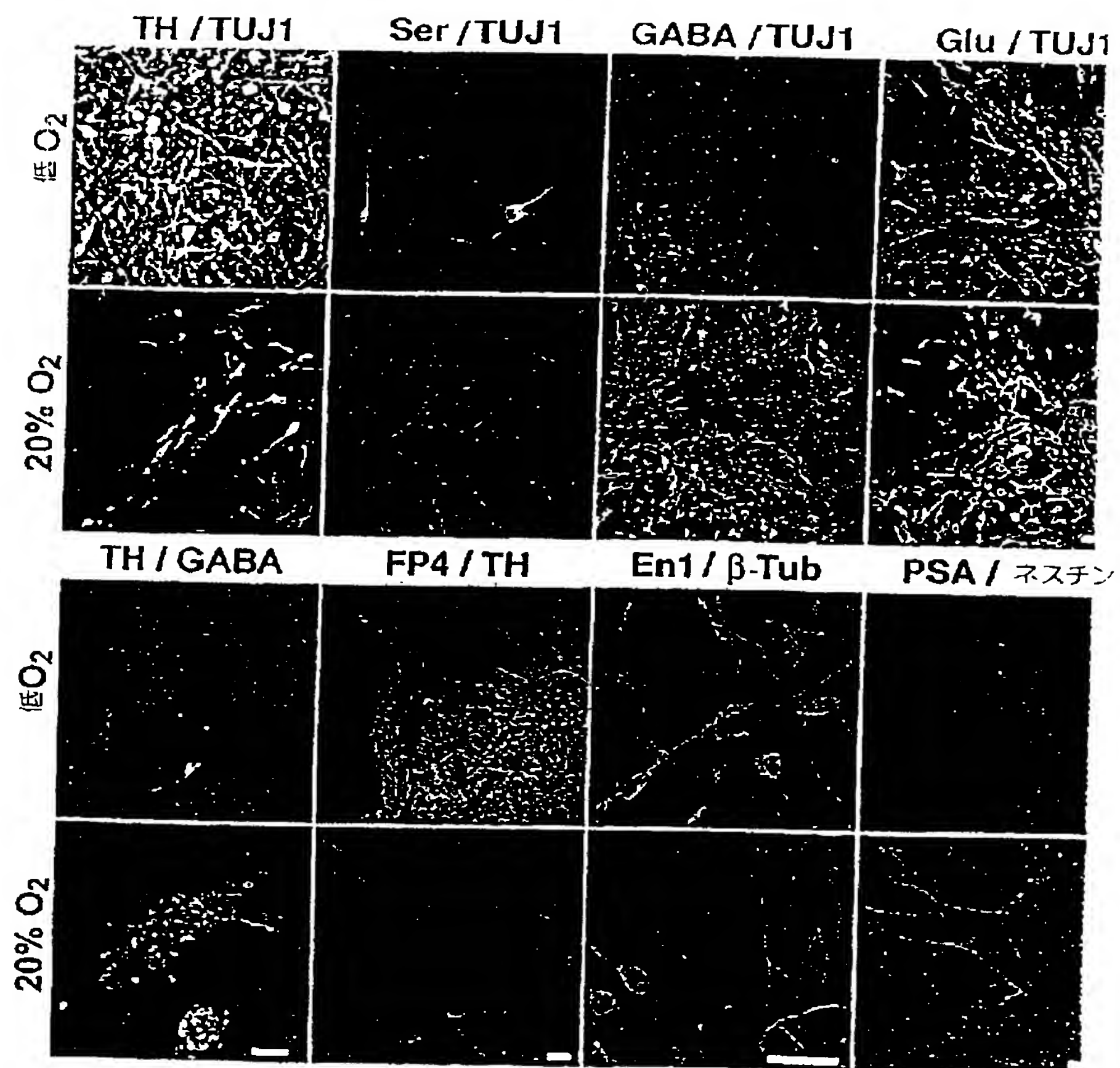


FIGURE 5

【図6】

**FIGURE 6**

【図7】

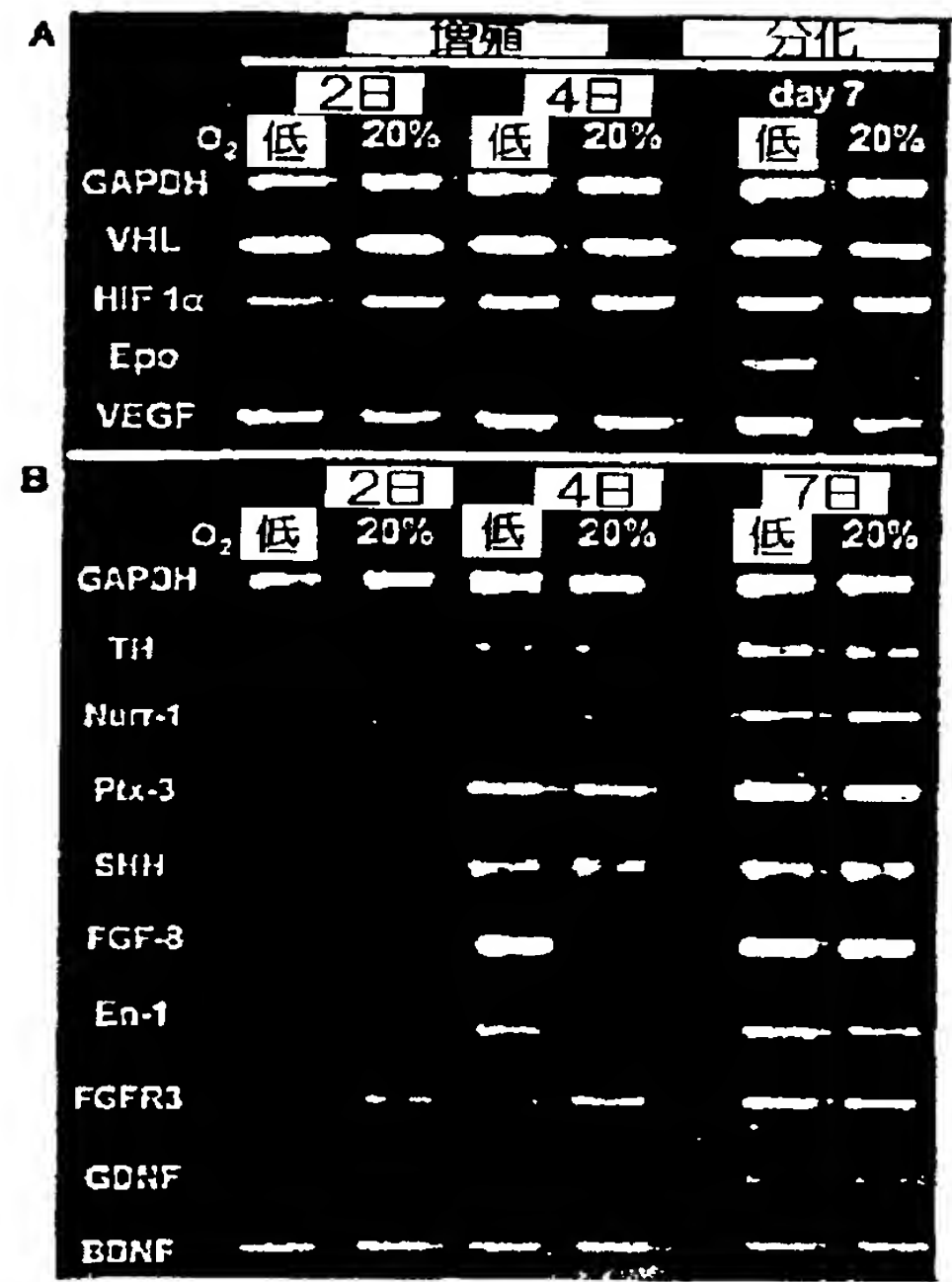
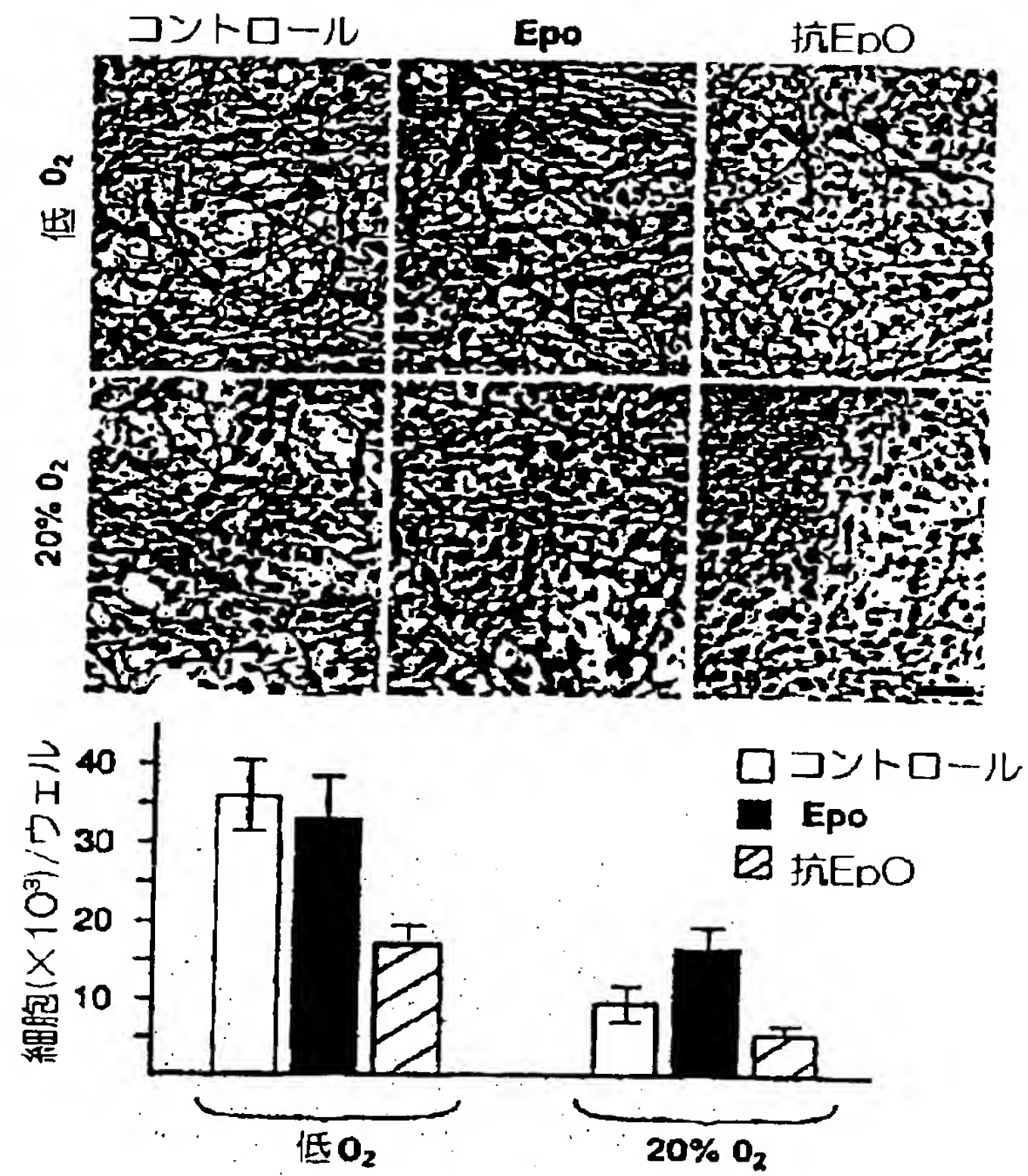


FIGURE 7

【図8】

**FIGURE 8**

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.  
PCT/US 99/27613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N5/00 A61P25/16	C12N5/10 A61K48/00 A61K35/30 A61P25/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 550 050 A (HOLLAND LAURA M ET AL) 27 August 1996 (1996-08-27) column 3, line 29 - line 55 column 4, line 23 - line 45 column 2, line 45 - line 52 column 8, line 48 - line 60 column 9, line 55 - line 65 column 10, line 7 - line 35; examples 1,4	1-29, 38-62
X	COLTON C.A. ET AL: "Protection from oxydation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons" EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 132, 1995, pages 54-61, XP000907393 cited in the application the whole document	1-20, 25-29, 38-42, 54-57, 59
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 May 2000		14/06/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer  Fernandez y Branas, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.  
PCT/US 99/27613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NURSE C.A. ET AL: "Role of basic FGF and oxygen in control of proliferation, survival, and neuronal differentiation in carotid body chromaffin cells" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 184, 1997, pages 197-206, XP000907400 abstract	30-37
X	US 5 750 376 A (REYNOLDS BRENT ET AL) 12 May 1998 (1998-05-12) column 6, line 36 -column 7, line 30 column 17, line 16 - line 37 column 20, line 57 -column 22, line 45	54-58
X	STUDER L. ET AL: "Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats" NATURE NEUROSCIENCE, vol. 1, no. 4, 1998, pages 290-295, XP002138903 the whole document	54-58
X	M.F. CZYZYK-KRZESKA: "Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, 1994, pages 760-764, XP002138904 the whole document	54,57



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/ 27613

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No.

PCT/US 99/27613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5550050 A	27-08-1996	AU 697600 B	08-10-1998
		AU 2382995 A	10-11-1995
		BR 9507391 A	16-09-1997
		CA 2187335 A	26-10-1995
		CN 1146155 A	26-03-1997
		CZ 9603004 A	12-03-1997
		EP 0756487 A	05-02-1997
		FI 964124 A	14-10-1996
		HU 75661 A	28-05-1997
		JP 10501792 T	17-02-1998
		LV 11730 A	20-04-1997
		LV 11730 B	20-02-1998
		NO 964358 A	13-12-1996
		PL 316845 A	17-02-1997
		SK 131696 A	04-06-1997
		WO 9528166 A	26-10-1995
		ZA 9603126 A	04-01-1996
US 5750376 A	12-05-1998	US 5981165 A	09-11-1999
		US 5980885 A	09-11-1999
		US 5851832 A	22-12-1998
		AU 697894 B	22-10-1998
		AU 8056194 A	29-05-1995
		CA 2175992 A	18-05-1995
		WO 9513364 A	18-05-1995
		CN 1141058 A	22-01-1997
		EP 0728194 A	28-08-1996
		FI 961855 A	04-06-1996
		JP 9507747 T	12-08-1997
		NO 961859 A	03-07-1996
		AU 714837 B	13-01-2000
		AU 3515295 A	09-04-1996
		CA 2200709 A	28-03-1996
		WO 9609543 A	28-03-1996
		EP 0783693 A	16-07-1997
		FI 971168 A	20-03-1997
		JP 10505754 T	09-06-1998
		NO 971245 A	18-03-1997
		AU 716811 B	09-03-2000
		AU 3836795 A	06-06-1996
		WO 9615226 A	23-05-1996
		CN 1170435 A	14-01-1998
		EP 0792350 A	03-09-1997
		FI 971956 A	04-07-1997
		JP 10509592 T	22-09-1998
		NO 972171 A	07-07-1997
		AU 665012 B	14-12-1995
		AU 2242592 A	11-02-1993
		CA 2113118 A	21-01-1993
		WO 9301275 A	21-01-1993
		EP 0594669 A	04-05-1994
		FI 935929 A	02-02-1994
		JP 6509225 T	20-10-1994
		NO 940056 A	03-03-1994
		WO 9416718 A	04-08-1994
		AU 683023 B	30-10-1997
		AU 5147493 A	09-05-1994
		CA 2147162 A	28-04-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 International Application No.  
 PCT/US 99/27613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5750376 A		WO 9409119 A	28-04-1994
		EP 0664832 A	02-08-1995
		FI 951677 A	07-04-1995
		JP 8502172 T	12-03-1996
		NO 951378 A	07-04-1995
		AU 703729 B	01-04-1999
		AU 4924197 A	12-03-1998
		AU 5367694 A	24-05-1994
		WO 9410292 A	11-05-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family sheet) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(72)発明者 セステ マリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

91030 サウス パサディナ マウンテン

ビュー アヴェニュー 1308

(72)発明者 ドイル ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

91030 サウス パサディナ マウンテン

ビュー アヴェニュー 1308

(72)発明者 ウォルド バーバラ ジェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

91108 サン マリノ アードモア ロー

ド 2780

(72)発明者 マッカイ ロン

アメリカ合衆国 メリーランド州 20892

ー4157 ベセスダ エムエスシー 4157

コンヴェント ドライヴ 36 エスエイ29

エヌアイエイチ/エヌアイエヌディーエ

ス エルエムビー ビルディング 36

(72)発明者 ストウダー ロレンツ

アメリカ合衆国 メリーランド州 20892

ー4157 ベセスダ エムエスシー 4157

コンヴェント ドライヴ 36 エスエイ29

エヌアイエイチ/エヌアイエヌディーエ

ス エルエムビー ビルディング 36

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA07 BA30 DA02 FA02

GA18 HA17

4B065 AA93X AB04 BA01 BC14

4C087 AA01 AA02 AA03 BB45 BB64

CA04 NA20 ZA15

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



Corr to JP2002  
5300#

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>7</sup> : <b>C12N 5/00, 5/10, A61K 48/00, 35/30, A61P 25/00, 25/16</b>		<b>A2</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 00/29550</b> (43) International Publication Date: 25 May 2000 (25.05.00)
(21) International Application Number: PCT/US99/27613 (22) International Filing Date: 18 November 1999 (18.11.99) (30) Priority Data: 09/195,569 18 November 1998 (18.11.98) US 09/425,462 22 October 1999 (22.10.99) US (63) Related by Continuation (CON) or Continuation-in-Part (CIP) to Earlier Applications US 09/195,569 (CIP) Filed on 18 November 1998 (18.11.98) US 09/425,462 (CIP) Filed on 22 October 1999 (22.10.99) (71) Applicant (for all designated States except US): CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US]; 1200 East California Boulevard, Pasadena, CA 91125 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): CESTE, Marie [US/US]; 1308 Mountain View Avenue, South Pasadena, CA 91030 (US). DOYLE, John [US/US]; 1308 Mountain View Avenue, South Pasadena, CA 91030 (US). WOLD, Barbara, J. [US/US]; 2780 Ardmore Road, San Marino,		CA 91108 (US). MCKAY, Ron [US/US]; NIH/NINDS, LMB, Bldg. 36, SA29, 36 Convent Drive, MSC 4157, Bethesda, MD 20892-4157 (US). STUDER, Lorenz [US/US]; NIH/NINDS, LMB, Bldg. 36, SA29, 36 Convent Drive, MSC 4157, Bethesda, MD 20892-4157 (US). (74) Agent: DUNCAN, Jeffrey, M.; Brinks Hofer Gilson & Lione, Post Office Box 10087, Chicago, IL 60610 (US). (81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>	
(54) Title: LOW OXYGEN CULTURING OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM PROGENITOR CELLS			
(57) Abstract <p>The present invention relates to the growth of cells in culture under conditions that promote cell survival, proliferation, and/or cellular differentiation. The present inventors have found that proliferation was promoted and apoptosis reduced when cells were grown in lowered oxygen as compared to environmental oxygen conditions traditionally employed in cell culture techniques. Further, the inventors found that differentiation of precursor cells to specific fates also was enhanced in lowered oxygen where a much greater number and fraction of dopaminergic neurons were obtained when mesencephalic precursors were expanded and differentiated in lowered oxygen conditions. Thus at more physiological oxygen levels the proliferation and differentiation of CNS precursors is enhanced, and lowered oxygen is a useful adjunct for <i>ex vivo</i> generation of specific neuron types. Methods and compositions exploiting these findings are described.</p>			

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



## **LOW OXYGEN CULTURING OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM PROGENITOR CELLS**

### **RELATED APPLICATIONS**

The present application is a continuation-in-part of U.S. Application number  
5 09/195,569 filed November 18, 1998. The entire text of the above referenced  
application is incorporated herein by reference without prejudice or disclaimer.

### **FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT**

The U.S. Government may have rights in the present invention pursuant to the  
terms of grant numbers AR40780-8 and AR42671-05 awarded by the National  
10 Institutes of Health and DARPA/AFOSR grant number F49620-98-1-0487.

### **FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to the growth of cells in culture. More  
particularly, the present invention provides methods and compositions for increasing  
cell survival, cell proliferation and/or cell differentiation along specific pathways by  
15 growing the cells in low ambient oxygen conditions.

### **BACKGROUND OF THE INVENTION**

In a time of critical shortages of donor organs, efforts to bring cellular  
transplantation into the clinical arena are urgently needed (Neelakanta & Csete,  
1996). Indeed, cellular and tissue transplantation is now well recognized as a  
20 desirable technique for the therapeutic intervention of a variety of disorders including  
cystic fibrosis (lungs), kidney failure, degenerative heart diseases and  
neurodegenerative disease. However, although this may be a desirable and much  
needed intervention, a major impediment to this type of therapeutic intervention is the  
lack of an available supply of viable, differentiated cells. Generally differentiated  
25 cells cannot be readily expanded in culture. Thus, methods of increasing the number  
and/or availability of differentiated, viable cells are needed.

The central nervous system (CNS) (brain and spinal cord) has poor  
regenerative capacity which is exemplified in a number of neurodegenerative

disorders, such as Parkinson's Disease. Although such diseases can be somewhat controlled using pharmacological intervention (L-dopa in the case of Parkinson's Disease), the neuropathological damage and the debilitating progression is not reversed. Cell transplantation offers a potential alternative for reversing neuropathological damage as opposed to merely treating the consequences of such damage.

Cultured CNS stem cells can self-renew, and after mitogen withdrawal, have an intrinsic capacity to generate oligodendrocytes, astrocytes, and neurons in predictable proportions (Johe *et al.*, 1996). Manipulation of this intrinsic differentiation capacity in culture has been used to define a complex array of factors that maintain, amplify, or diminish a particular differentiated phenotype. Most such studies emphasize a primary role for transcription factors in defining CNS lineage identity, as well as growth and trophic factors acting locally and over long distances (Johe *et al.*, 1996, Panchinsion *et al.*, 1998). Dopaminergic neurons and their progenitors from these cultures are of special interest as potential sources of replacement cellular therapies for Parkinson's Disease patients (reviewed in Olanow *et al.*, 1996).

Ideally, *ex vivo* culture conditions should reproduce the *in vivo* cellular environment with perfect fidelity. This ideal is especially pertinent when explants are used to study development, because conditions may be defined for cell fate choice and differentiation. For CNS stem cell cultures, in particular, maximizing survival, proliferation, and cell fate choice leading to dopaminergic neurons is essential for future cellular transplant therapies. Thus, understanding and control of the differentiation of such cells is crucial for providing a viable, useful product that can be used in transplantation or for studying the behavior of CNS cells, *in vitro*, in response to various conditions.

In embryogenesis, each tissue and organ develops by an exquisitely organized progression in which relatively unspecialized or "undifferentiated" progenitor or stem cells give rise to progeny that ultimately assume distinctive, differentiated identities and functions. Mature tissues and organs are composed of many types of differentiated cells, with each cell type expressing a particular subset of genes that in turn specifies that cell's distinctive structure, specialized function, and capacity to

interact with and respond to environmental signals and nutrients. These molecular, structural and functional capacities and properties comprise the cell phenotype. Similarly, coupled cell proliferation and/or differentiation occurs, in the presence of changing local O<sub>2</sub> supply, when an injured or degenerating adult tissue undergoes repair and regeneration. The level of oxygen is especially pertinent in many regeneration paradigms in which normal blood supply is reduced or even transiently stopped by trauma or embolic events (myocardial infarction, stroke and the like).

Therefore, in clinical settings, gases are appreciated as a primary variable in organ survival, with oxygen as the critical gas parameter. Virtually all modern cell culture is conducted at 37°C in a gas atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. These conditions match core human body temperature and approximate quite well physiologic CO<sub>2</sub> concentrations. For example, mean brain tissue CO<sub>2</sub> is 60 mm Hg or about 7% (Hoffman *et al.*, 1998). However, in striking contrast, oxygen in standard tissue culture does not reflect physiologic tissue levels and is, in fact, distinctly hyperoxic.

At sea level, (unhumidified) room air contains 21% O<sub>2</sub> which translates into an oxygen partial pressure of 160 mm Hg [0.21(760 mm Hg)]. However, the body mean tissue oxygen levels are much lower than this level. Alveolar air contains 14% oxygen, arterial oxygen concentration is 12%, venous oxygen levels are 5.3%, and mean tissue intracellular oxygen concentration is only 3% (Guyton, and Hall, 1996). Furthermore, direct microelectrode measurements of tissue O<sub>2</sub> reveal that parts of the brain normally experience O<sub>2</sub> levels considerably lower than total body mean tissue oxygen levels, reflecting the high oxygen utilization in brain. These studies also highlight considerable regional variation in average brain oxygen levels (Table 1) that have been attributed to local differences in capillary density. Mean brain tissue oxygen concentration in adult rates is 1.5% (Silver and Erecinska, 1988), and mean fetal sheep brain oxygen tension has also been estimated at 1.6% (Koos and Power, 1987).

**Table 1**

Regional rat brain tissue partial pressures of oxygen measured by microelectrode

Brain area	%O <sub>2</sub>
Cortex (gray)	2.5-5.3
Cortex (white)	0.8-2.1
Hypothalamus	1.4-2.1
Hippocampus	2.6-3.9
Pons, fornix	0.1-0.4

5

Adapted from Silver, L, Erecinska, M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. In *Oxygen Transport to Tissue XX*, 7-15, edited by Hudetz and Bruley, Plenum Press, New York (1988).

Thus, from the discussion above it is clear that under standard culture conditions, the ambient oxygen levels are distinctly hyperoxic, and not at all within physiologic ranges. These conditions of cell growth are have been historically inadequate for generating cells and tissues for transplantation into the brain or other area of the body or for providing an accurate *in vitro* model of what is occurring *in vivo*. Thus, there remains a need for methods to produce differentiated cells which can be used for therapeutic and research purposes. The present invention is directed to providing such methods.

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to growing cells in low ambient oxygen conditions in order to mimic the physiological oxygen conditions with greater fidelity. The growth of these cells in such conditions provides certain surprising and unexpected results. These results are exploited and described in further detail herein. More particularly, the present invention describes methods that may independently be useful in increasing cell survival, cell proliferation and/or cell differentiation along specific pathways.

In specific embodiments, the present invention describes a method of increasing cell differentiation comprising culturing undifferentiated central nervous system (CNS) cells in low ambient oxygen conditions, wherein the low ambient oxygen conditions promotes the cellular differentiation of the neuronal cells. The definitions of low ambient oxygen conditions are described in depth elsewhere in the specification. However, it is contemplated that in specific embodiments the low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 0.25% to about 18% oxygen. In other embodiments, the ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 0.5% to about 15% oxygen. In still other embodiments, the low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 1% to about 10% oxygen. In further embodiments, the low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 1.5% to about 6% oxygen. Of course, these are exemplary ranges of ambient oxygen conditions to be used in culture and it should be understood that those of skill in the art will be able to employ oxygen conditions

falling in any of these ranges generally or an oxygen conditions between any of these ranges that mimics physiological oxygen conditions for CNS cells. Thus, one of skill in the art could set the oxygen culture conditions at 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, or any other oxygen condition between any of these figures.

The cells employed in the method described may be any cells that are routinely used for CNS studies. As such, the cells may be primary tissue culture cells or derived from a cell line. The cells may be fetal cells or adult cells. In specific embodiments, it is contemplated that the cells may be selected from the group consisting of central nervous system stem cells, spinal cord-derived progenitor cells, glial cells, astrocytes, neuronal stem cells, central nervous system neural crest-derived cells, neuronal precursor cells, neuronal cells, hepatocytes, and bone marrow derived cells. In preferred embodiments, it is contemplated that the cells may be mesencephalic progenitor cells, lateral ganglionic precursor cells, cortical precursor cells, astrocytes or neuroblasts.

The method may comprise determining the amount, level or degree of differentiation. Those of skill in the art are familiar with technologies employed to determine cellular differentiation. The differentiation may be determined by monitoring a differentiation specific phenotype in the cells. For example, the differentiation specific phenotype determined may be by monitoring message level, protein level, subcellular localization, functional assays or morphological changes.

There are various techniques that may be employed for determining message level including but not limited to PCR<sup>TM</sup>, *in situ* hybridization, RNase protection assay, or single cell PCR<sup>TM</sup>. In specific embodiments, the present invention may monitor the message level for nestin, tyrosine hydroxylase, GAPDH; BDNF; GDNF; FGFR3; En1; FGF8; SHH; Ptx3; Nurr1; VEGF; EPO; HIF1 $\alpha$  or VHL. Of course these are exemplary differentiation markers for CNS cells or markers of cellular responses to oxygen and it is contemplated that those of skill in the art will be able to substitute additional similar markers for the markers specifically described herein without undue experimentation. Other embodiments monitor protein level by, for example, using antibody staining, HPLC, western blotting or immunoprecipitation. In



more particular embodiments, the protein level monitored is the level of nestin, tyrosine hydroxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase or dopamine transporter. The functional assay typically will be one that monitors a particular function of the selected CNS cells. A particularly useful functional assay may be one which monitors the rate of dopamine production.

A preferred feature of the present invention is that the low oxygen conditions produce a cell population that is enriched in dopaminergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions. Another preferred embodiment is that the low oxygen conditions produce a cell population that is enriched in serotonergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions. In still additional embodiments, the low oxygen conditions produce a cell population that is depleted in GABAergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions. Further, certain methods of the present invention will provide low oxygen conditions to produce a cell population that is depleted in glutaminergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions.

In preferred embodiments, the method may further comprise growing the cells in the presence of a neuronal growth stimulant, mitogen, cytokine, neuroprotective factor or an anti-apoptotic agent. The inventors have found that there was a significant increase in EPO expression as a result of lowered oxygen versus 20% O<sub>2</sub>. In particular embodiments, the differentiated phenotype is retained after transfer of the cells from the low ambient oxygen conditions to 20% oxygen culture conditions. In specific embodiments, it is contemplated that the cells may be grown in low ambient oxygen conditions for multiple generations prior to transfer to 20% oxygen culture conditions. In other embodiments, the cells may be continuously maintained in low ambient oxygen conditions.

Another aspect of the present invention provides a method of inhibiting apoptosis of a CNS cell in culture comprising growing the cell in low ambient oxygen conditions.

Yet another embodiment provides a method of increasing the expansion of a CNS cell in culture comprising growing the cell in low ambient oxygen, wherein the

cells exhibit increased expansion in the low ambient oxygen as compared to growing the cell in 20% oxygen incubator conditions.

In an additional embodiment, the present invention further contemplates a method of increasing cell proliferation in culture comprising growing CNS cells in low ambient oxygen, wherein the growth in low ambient oxygen increases cell proliferation compared to growing the cells in 20% oxygen incubator conditions.

Also provided is a method of preparing a cell for use against a neurodegenerative disorder comprising obtaining a population of CNS cells and growing the cells in low ambient oxygen conditions wherein the low ambient oxygen conditions increases the expression of a gene involved in the neurodegenerative disease. In specific embodiments, the neurodegenerative disease is Parkinson's Disease and the gene is tyrosine hydroxylase (TH).

The method further may comprise contacting the cell(s) with a first polynucleotide encoding a dopamine biosynthetic protein under conditions suitable for the expression of the protein wherein the polynucleotide is under the transcriptional control of a promoter active in the cells. In addition, the method further may comprise contacting the cell with a first polynucleotide encoding a dopamine releasing protein under conditions suitable for the expression of the protein wherein the polynucleotide is under the transcriptional control of a promoter active in the cells. Also contemplated is a method further comprising contacting the cell with a second polynucleotide encoding a dopamine releasing protein under conditions suitable for the expression of the protein wherein the polynucleotide is under the transcriptional control of a promoter active in the cells. Other embodiments involve contacting the cell with a second polynucleotide encoding a dopamine biosynthetic protein under conditions suitable for the expression of the protein wherein the polynucleotide is under the transcriptional control of a promoter active in the cells.

In more particular embodiments, the dopamine biosynthesis protein may be TH; L-amino acid decarboxylase (AADC), erythropoietin or any other protein directly or indirectly involved in dopamine synthesis. The dopamine releasing protein is a vesicular monoamine transporter (VMAT), which may be VMAT1 or VMAT2. In specific embodiments, the first and second polynucleotides are under control of different promoters. The promoter may be any promoter known to those of skill in the

art that will be operative in the cells being used. For example, it is contemplated that the promoter may be CMV IE, SV40 IE,  $\beta$ -actin, TH promoter, AADC promoter, and nestin promoter. It is contemplated that the first and second polynucleotides each may be covalently linked to a polyadenylation signal.

5 Also encompassed by the present invention is a cell produced according to the method comprising obtaining a starting CNS cell and growing the cell in low ambient oxygen conditions wherein the conditions produce a differentiated neuronal cell. In specific embodiments, the starting cell is a nestin-positive cell. More particularly, the low ambient conditions produce a nestin-negative differentiated cell more rapidly and  
10 in greater numbers than traditional cell culture conditions. In specific embodiments, the low ambient conditions produce a TH positive cell. In other embodiments, the cell further comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding an exogenous gene wherein the polynucleotide is operatively linked to a promoter.

Another aspect of the present invention provides a method of treating  
15 Parkinson's disease in a subject comprised of obtaining cells suitable for transplanting in the subject; growing the cells in low ambient oxygen conditions; and implanting the cells grown in the low ambient oxygen conditions into the subject; wherein the implanted cells have an increased capacity to produce dopamine in the subject as compared to similar cells grown in 20% oxygen incubator conditions. In specific  
20 embodiments, the cells are from the subject and have been transduced with a polynucleotide that expresses a protein that increases dopamine production and are treated or expanded in lowered oxygen conditions. In other preferred embodiments, the cells are CNS cells from a source other than the subject. In preferred embodiments, the cells are transduced with a polynucleotide that expresses a protein  
25 that increases dopamine production and are treated or expanded in lowered oxygen conditions.

Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating preferred  
30 embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

## BRIEF DESCRIPTION OF SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

**FIG. 1. Effect of lowered oxygen on precursor yield *in vitro* at varying plating densities.** Striatal cultures were expanded with bFGF in lowered or ambient oxygen, and total cell numbers assessed after 5 days of proliferation when over 95% of cells are nestin<sup>+</sup> precursors. Significantly increased cell numbers were detected at all densities in lowered O<sub>2</sub> compared to ambient oxygen.

**FIG. 2. Lowered oxygen culturing leads to increased proliferation of CNS precursors.** FIG. 2A. Mesencephalic precursors were pulsed with 10  $\mu$ M BrdU for 60 minutes immediately before fixation, then stained for BrdU uptake. More BrdU<sup>+</sup> cells were seen in lowered oxygen cultures during both proliferation and differentiation. Scale bar = 20  $\mu$ m. FIG. 2B. Mesencephalic precursors in lowered O<sub>2</sub> yielded an increased percentage of BrdU<sup>+</sup> cells and a greater absolute number of BrdU<sup>+</sup> cells than cultures maintained at 20% O<sub>2</sub>. Data are given as mean  $\pm$  SEM, n=40. Differences between lowered and 20% O<sub>2</sub> were statistically significant at all time points and for all parameters (n=8, p < 0.05) except percentage of BrdU<sup>+</sup> cells at day 4 of expansion (n=8, p = 0.10).

**FIG. 3. CNS precursors cultured in lowered (vs. 20%) O<sub>2</sub> have reduced rates of apoptosis.** FIG. 3A. Apoptosis was assayed by TUNEL labeling of mesencephalic precursors cultured in parallel at either lowered or 20% O<sub>2</sub>. Representative figures of the expansion phase (2 and 6 days of culture) and the differentiation phase (4 days after bFGF withdrawal) are shown. Scale bar = 20  $\mu$ m. FIG. 3B. Precursors grown at lowered O<sub>2</sub> showed a significant decrease in the percentage of apoptotic cells (n=8, p < 0.05) compared to traditional cultures.

**FIG. 4. Basic differentiation patterns of CNS stems in lowered and 20% O<sub>2</sub> cultures.** FIG. 4A. Striatal cultures in lowered or 20% O<sub>2</sub> were assessed for the

relative percentages of precursor-derived neurons (by TUJ1 stain), astrocytes (GFAP) and oligodendrocytes (Gal-C) after 5 days of bFGF proliferation followed by four days of cell differentiation (for quantification see text). FIG. 4B. Passaged mesencephalic precursors were proliferated for 6 days and differentiated for 5 days in lowered or 20% O<sub>2</sub> and analyzed for O4, a marker of oligodendrocyte precursors. O4+ cells could be detected only in lowered oxygen cultures. FIG. 4C. Nestin+ clones were derived from single passaged mesencephalic precursor cells after 20 days of bFGF proliferation (left panel). Clones in lowered oxygen differentiated into TUJ1+ neurons upon bFGF withdrawal (right panel). FIG. 4D. Lowered O<sub>2</sub> promotes clone formation efficiency. The yield of clones derived from single precursors was 3-fold higher in lowered O<sub>2</sub> compared to 20% O<sub>2</sub> cultures (left panel). The majority of clones derived from precursors in O<sub>2</sub> oxygen cultures contained 50 – 500 cells whereas clone size in 20 % O<sub>2</sub> cultures was generally 5 – 50 cells (right panel). Scale bar = 20 µm in all panels.

**FIG. 5. Lowered O<sub>2</sub> culturing improves the yield of functional precursor-derived dopaminergic neurons.** FIG. 5A and FIG. 5B. Precursors from E12 mesencephalon were proliferated with bFGF for 5 days followed by 5 days of differentiation, then stained for the neuronal marker TUJ1 and for TH. A large increase in total number (and percentage) of TH+ neurons was detected ( $p < 0.001$ ) in lowered O<sub>2</sub> compared to 20% O<sub>2</sub> cultures. Scale bar = 20 µm. FIG. 5C. Quantification of TH protein level by Western blot analysis revealed significantly more TH in samples from lowered (vs. 20%) O<sub>2</sub> cultures. Each lane was loaded with 2.5µg total protein. FIG. 5D. rp-HPLC with electrochemical detection was used to quantify dopamine levels in conditioned medium (24 hrs), in HBSS after 15 minutes of conditioning (basal release), and in HBSS+56 mM KCl after 15 minutes (evoked release). Significantly more dopamine was detected in cultures maintained at lowered O<sub>2</sub> compared to those grown at 20% O<sub>2</sub> under all these conditions (conditioned medium  $p < 0.01$ ; basal and evoked release  $p < 0.05$ ). Inset shows typical chromatogram for dopamine detection in lowered and 20% O<sub>2</sub> cultures.

**FIG. 6. Neuronal subtype differentiation from mesencephalic precursors in lowered vs. 20% O<sub>2</sub>.** Double immunocytochemical labeling revealed that lowered O<sub>2</sub>

culturing markedly increased the representation of dopaminergic and serotonergic neuronal (Tuj1+) subtypes, but decreased the representation of GABA+ and Glutamate+ neurons. Colony depicted in GABA stain at 20% O<sub>2</sub> is an unusual example of very high GABA expression under these conditions. TH and GABA were not co-expressed as seen in some developing neurons *in vivo*. Floor plate cells (FP4+) were more numerous in lowered O<sub>2</sub> cultures as was the percentage of neurons expressing the midbrain transcription factor En1. Precursor markers nestin and PSA-NCAM were both reduced in lowered O<sub>2</sub> cultures after differentiation compared to 20% O<sub>2</sub> conditions (lower right panels). Scale bars = 20 μm.

**FIG. 7.** Differential gene expression in mesencephalic precursors at lowered and 20% O<sub>2</sub> assessed by RT-PCR. FIG. 7A. Expression of genes involved in the physiological response to changes in oxygen levels. The expression of HIF1α, VHL, EPO and VEGF was assessed after 2 or 6 days of expansion and after differentiation (day 4 of differentiation = day 10 of culture) in lowered and 20% O<sub>2</sub>. Data are normalized to GAPDH expression. A significant increase in EPO expression was detected in lowered oxygen versus 20% O<sub>2</sub> mostly during cell differentiation, whereas VEGF was upregulated during both expansion and differentiation. Surprisingly, no major oxygen-dependent regulation of HIF1α or VHL was observed. FIG. 7B. Candidate genes involved in midbrain development were also tested for O<sub>2</sub>-dependent differential expression. Increased expression of TH and Ptx-3 during cell differentiation confirmed the larger number of functional dopaminergic neurons in lowered oxygen cultures (compare FIGs. 5). Significant lowered O<sub>2</sub>-mediated changes in expression levels of FGF8 and En1 were also detected.

**FIG. 8.** EPO mimics the lowered oxygen effect on dopaminergic differentiation. Saturating concentrations of EPO or EPO neutralizing antibody were added to E12 mesencephalic precursor cultures during both proliferation and differentiation phase (5 days each) in lowered or 20% O<sub>2</sub>. EPO supplementation significantly increased TH+ cell numbers in 20% O<sub>2</sub> cultures (n=6, p < 0.05). EPO neutralizing antibody decreased TH+ cell numbers in both lowered oxygen (n=6, p < 0.01) and 20% O<sub>2</sub> cultures (n=6, p < 0.05). Scale bar = 20μm.



## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In order for cell transplantation therapies to become widely and universally used there is a need for availability of appropriately differentiated, viable cells. Preferably, these cells need to be resilient enough that they can be cryopreserved without loss of phenotypic integrity. The high incubator O<sub>2</sub> levels in which the cells are grown at ambient air O<sub>2</sub> levels (referred to herein as traditional O<sub>2</sub> conditions; or 20% O<sub>2</sub> culture conditions) do not facilitate the production of such cells. These cells often do not survive, proliferate or differentiate in sufficient numbers to be useful. As such expansion of these cells in traditional culture yields a cell that is at best inadequate for use in *in vitro* model assay studies let alone for use in transplantation.

The present invention is directed towards providing methods and compositions for producing cells that are differentiated, viable, amenable to cryopreservation and provide an accurate indication of how such cells behave biochemically in an *in vivo* setting. As such, these methods will provide cells that can be used *in vitro* to perform characterization studies or *in vivo* as replacement therapies for cells that have been damaged by disease, injury resulting from trauma, ischemia, or a drug-induced injury. Further, it should be noted that the method leads to increased survival of undifferentiated precursors that could also be used for transplantation, which when placed in the appropriate environmental conditions will differentiate down the appropriate pathway.

The present invention particularly contemplates the use of culture conditions using subatmospheric/physiological oxygen to culture or enrich a population of neuronal cells with cells that are expanded and/or differentiated to express a particular neuronal phenotype. The increase in cell differentiation may be such that the process of a cell being converted from a primitive undifferentiated state to one in which a particular cellular phenotype (dopaminergic phenotype; GABAergic phenotype; serotonergic phenotype or the like) is expressed. Specifically, it appears that growth in low O<sub>2</sub> conditions results in an enrichment in dopaminergic and serotonergic neuronal populations, whereas GABAergic and glutaminergic neurons are relatively decreased. These enriched populations may be subject to further enrichment through such methods such as cell sorting.

Alternatively, it may be that the increase in differentiation produced by this method is such that the relative percentage of cells that go on to differentiate (as opposed to remaining in an undifferentiated state) is increased in low oxygen. However, incubation of a pluripotent cell line under low O<sub>2</sub> incubation conditions *in vitro*, will allow the manipulation or skewing of the direction of differentiation of the cell population. Thus, the oxygen is used to control the number and percentage of one type of cell in the population increased or decreased because the differentiation pathway changes under influence of the gas. Thus, enrichment of the CNS cells by physiologic or low levels of oxygen may be the result of one or more mechanisms that include (1) increase in the absolute number of CNS cells, (2) enrichment by selective survival of CNS cells, (3) enrichment of CNS by their selective proliferation or (4) enrichment of specific differentiation pathways.

Any increase in the number of CNS cells is significant in that more cells are then available to regenerate a greater volume of new tissue. An enrichment, even without increase in number, is important in applications where limitations on total cell number are pertinent or when the effects of the non-CNS progenitor cell contaminants are negative for the desired outcome or for defining the material adequately. Any enhancement of survival of the CNS cell, even without increase in cell number or any enrichment of cell types is valuable in settings where culture is required (*i.e.*, to handle tissue before administration of cell therapy, or to permit any other procedure during which the cells must survive such as transfection of genes, drug treatment, or enrichment by cell sorting or other additional procedures).

A particular embodiment of the present invention demonstrates that growth of CNS cells, or indeed any pluripotent stem cell in subatmospheric culture conditions reduces the level of apoptotic and non-apoptotic cell death. It is likely that the increased survival of the cells may be due to both an inhibition of apoptosis and non-apoptotic death. Apoptosis or programmed cell death is a well known phenomenon and can be measured by techniques well known to those of skill in the art.

A particular and novel aspect of the methods of the present invention is that such methods all employ low ambient culture growth conditions. By the term "low ambient oxygen conditions", the present invention refers to any culturing conditions below atmospheric oxygen. Thus in particular embodiments, low ambient O<sub>2</sub>

conditions are defined as between about 0.5% and about 18%. Ideally, the culture oxygen conditions are kept as close as possible to the normal physiological oxygen conditions in which a particular cell would be found in *in vivo* the better. Clearly, this will mean that those conditions employed for cells will depend on the regional origin of a particular cell. For example, cells from an alveolar origin may prefer growth at about 14% O<sub>2</sub>; cells from an arterial source will prefer an oxygen concentration of about 12%; whereas those from certain regions of the brain may prefer oxygen conditions as low as about 1.5%.

It should be noted that the low ambient oxygen conditions are not to be considered the same as "hypoxic" conditions. The low ambient oxygen conditions are intended to mimic physiological conditions. As defined herein "hypoxic conditions" are those in which the oxygen level is less than 0.1% O<sub>2</sub> (Gross *et al.*, 1999).

The low ambient oxygen conditions thus will be used to promote differentiation of CNS cells, inhibit apoptosis of cells in culture, increase expansion of cells, and otherwise make such cells amenable for use in transplantation. Such methods and compositions are outlined in further detail below.

## Definitions

The present section provides definitions of the terms used in the present invention in order to facilitate a better understanding of the invention.

A "stem cell" is a relatively undifferentiated cell that can be induced to proliferate and that can produce progeny that subsequently differentiate into one or more mature cell types, while also retaining one or more cells with parental developmental potential. In many biological instances, stem cells are also "multipotent" because they can produce progeny of more than one distinct cell type, but this is not required for "stem-ness." Self-renewal is the other classical part of the stem cell definition, and it is essential as used in this document. In theory, self-renewal can occur by either of two major mechanisms. Stem cells may divide asymmetrically, with one daughter retaining the stem state and the other daughter expressing some distinct other specific function and phenotype. Alternatively, some of the stem cells in a population can divide symmetrically into two stems, thus maintaining some stem cells in the population as a whole, while other cells in the

population give rise to differentiated progeny only. Formally, it is possible that cells that begin as stem cells might proceed toward a differentiated phenotype, but then “reverse” and re-express the stem cell phenotype.

“Progenitor cells” have a cellular phenotype that is more primitive (*i.e.*, is at an earlier step along a developmental pathway or progression than is a fully differentiated cell). Often, progenitor cells also have significant or very high proliferative potential. Progenitor cells may give rise to multiple distinct differentiated cell types or to a single differentiated cell type, depending on the developmental pathway and on the environment in which the cells develop and differentiate. Like stem cells, it is possible that cells that begin as progenitor cells might proceed toward a differentiated phenotype, but then “reverse” and re-express the progenitor cell phenotype.

“Differentiation” refers to the developmental process whereby cells assume a specialized phenotype, *i.e.*, acquire one or more characteristics or functions distinct from other cell types. In most uses, the differentiated phenotype refers to a cell phenotype that is at the mature endpoint in some developmental pathway. In many but not all tissues, the process of differentiation is coupled with exit from the cell cycle—in these cases, the cells lose or greatly restrict their capacity to proliferate when they differentiate.

“Subatmospheric” conditions mean any oxygen concentration below about 20%, preferably below about 15%, more preferably below about 10%, at sea level. The term subatmospheric may be used herein interchangeably with “low oxygen conditions” defined above.

“Atmospheric O<sub>2</sub> conditions” are those conditions found in the air, *i.e.*, 20-21% O<sub>2</sub>. As used herein this term is used interchangeably with the term “traditional” O<sub>2</sub> conditions as traditional tissue culture incubators are kept at atmospheric O<sub>2</sub> conditions.

“Physiologic” oxygen levels are the range of oxygen levels normally found in healthy tissues and organs. These levels vary depending on tissue type (Table 1). However, it is of note that this rate is below 15% in all tissues and below 8% in most tissues. Thus the physiological oxygen levels can range from about 15% to about 1.5% depending upon the region of the body being measured.

“Hypoxia” occurs when the normal physiologic levels of oxygen are not supplied to a cell or tissue. “Normoxia” refers to normal physiologic levels of oxygen for the particular cell type, cell state or tissue in question. “Anoxia” is the absence of oxygen. “Hypoxic conditions” are those leading to cellular hypoxia. These conditions depend on cell type, and on the specific architecture or position of a cell within a tissue or organ, as well as the metabolic status of the cell. A critical point is that in most cell biology research of the past 25 years, ambient atmospheric oxygen levels of 20-21% are routinely called and experimentally taken to be “normoxic,” but this assumption is physiologically erroneous. In this historic context, much cell culture literature refers to any condition with oxygen lower than ambient atmospheric as “hypoxic,” but this usage is also physiologically incorrect.

“Acidosis” means that the pH is below normal physiologic levels.

“Enriching” of cells means that the yield (fraction) of cells of one type is increased over the fraction of cells in the starting culture or preparation.

“Proliferation” refers to an increase in the number of cells in a population (growth) by means of cell division. Cell proliferation is generally understood to result from the coordinated activation of multiple signal transduction pathways in response to the environment, including growth factors and other mitogens. Cell proliferation may also be promoted by release from the actions of intra- or extracellular signals and mechanisms that block or negatively affect cell proliferation.

“Regeneration” means re-growth of a cell population, organ or tissue after disease or trauma.

Other terms used throughout the specification will have the meaning commonly assigned by those of skill in the art unless otherwise stated.

### Central Nervous System Cells

As mentioned earlier, a particular advantage of the present invention is that it can be used to generate viable cells or tissue that can be used to ameliorate neurodegenerative disorders. Such cells or tissue upon transplantation can be referred to as a graft. The cells for transplantation can include but are not limited human or animal neurons for stroke, brain and spinal cord injury, Alzheimer's Disease,

Huntington's Disease and other neurodegenerative disorders; septal and GABAergic cells for epilepsy; ventral mesencephalic or other CNS dopaminergic cells for treatment of Parkinson's Disease; and trophic factor secreting cells for neurological disorders, or even certain psychiatric disorders. The cells to be used as grafts can be from primary tissue or even from certain cell lines. Further it should be understood that any of the cell types mentioned herein throughout may be adult cells or from a fetal origin.

For treatment of neurological disorders, the present invention will produce differentiated neural stem cells that proliferate and differentiate. Undifferentiated neural progenitor cells differentiate into neuroblasts and glioblasts which give rise to neurons and glial cells. During development, cells that are derived from the neural tube give rise to neurons and glia of the CNS. Certain factors present during development, such as nerve growth factor (NGF), promote the growth of neural cells. Methods of isolating and culturing neural stem cells and progenitor cells are well known to those of skill in the art (Hazel and Muller, 1997; U.S. Patent No. 5,750,376).

Suitable neural cells may be obtained from suitable solid tissues these include any organ or tissue from adult, post-natal, fetal or embryonic mammalian tissue. Any mammal can be used in this invention, including mice, cattle, sheep, goat, pigs, dogs, rats, rabbits, and primates (including human). Specific examples of suitable solid tissues include neurons or central nervous system supporting cells derived from brain tissue, germ cells or embryonic stem cells. Stem cells and progenitor cells isolated from any other solid organ (liver, pancreas, spleen, kidney, thyroid, etc.) or those from marrow, spleen or blood are also amenable candidates for culturing under physiologic or hypoxic conditions.

Hazel and Muller describe methods of isolating, culturing, and differentiating rat brain neuroepithelial stem cells from both fetal and adult rat brains. Briefly, neural precursors are removed from desired regions of the fetal rat central nervous system by dissection, dissociated to a single-cell suspension, and plated on tissue culture dishes in medium containing the mitogen basic fibroblast growth factor (bFGF). Initially, many of the differentiated neurons die. Proliferating cells are then harvested in a buffered solution. The passaged cells are relatively homogenous for multipotent



precursors. To induce differentiation to neurons and glia, the media containing bFGF is removed and replaced with media lacking bFGF.

Subatmospheric culturing conditions can be used in such a protocol from the start of stem cell isolation, in order to enrich the stem cell pool and enhance differentiation into a greater number of cells. Subatmospheric/physiologic culture conditions can also be used after initial plating and division, to up-regulate certain gene products in the more differentiated brain cells. Subatmospheric/physiologic culture conditions can also be used throughout the process to enhance the function of the entire population for transplantation.

Detection of neural stem cell derivatives can be determined by antibody staining. For example, central nervous system multipotential stems are marked by high level expression of the intermediate filament, nestin (Hazel & Muller, 1997). The differentiated neurons are marked by the antibody TUJ1 (O'Rourke *et al.*, 1997), oligodendrocytes by GalC (Bosio *et al.*, 1996), and astrocytes by GFAP antibodies (Rutka *et al.*, 1997).

The methods of the present invention may be used to produce neural cells containing a heterologous gene. Methods of producing cells of neural origin comprising a heterologous gene and uses of such cells are described in U.S. Patent No. 5,750,376 (incorporated herein by reference).

## Culture Conditions

Suitable medium and conditions for generating primary cultures are well known in the art and vary depending on cell type. For example, skeletal muscle, bone, neurons, skin, liver, and embryonic stem cells are all grown in media differing in their specific contents. Furthermore, media for one cell type may differ significantly from lab to lab and institution to institution. As a general principle, when the goal of culturing is to keep cells dividing, serum is added to the medium in relatively large quantities (10-20% by volume). Specific purified growth factors or cocktails of multiple growth factors can also be added or sometimes used in lieu of serum. As a general principle, when the goal of culturing is to reinforce differentiation, serum with its mitogens is generally limited (serum about 1-2% by

volume). Specific factors or hormones that promote differentiation and/or promote cell cycle arrest can also be used.

Physiologic oxygen and subatmospheric oxygen conditions can be used at any time during the growth and differentiation of cells in culture, as a critical adjunct to selection of specific cell phenotypes, growth and proliferation of specific cell types, or differentiation of specific cell types. In general, physiologic or low oxygen-level culturing is accompanied by methods that limit acidosis of the cultures, such as addition of strong buffer to medium (such as Hepes), and frequent medium changes and changes in CO<sub>2</sub> concentration.

Cells can be exposed to the low oxygen conditions using a variety of means. Specialized laboratory facilities may have completely enclosed environments in which the oxygen levels are controlled throughout a dedicated, isolated room. In such specialized areas, low oxygen levels can be maintained throughout the isolation, growth and differentiation of cells without interruption. Very few laboratories have such specialized areas. Physiologic or low oxygen culturing conditions also can be maintained by using commercially-available chambers which are flushed with a pre-determined gas mixture (*e.g.*, as available from Billups-Rothenberg, San Diego CA). As an adjunct, medium can be flushed with the same gas mixture prior to cell feeding. In general, it is not possible to maintain physiologic or low oxygen conditions during cell feeding and passaging using these smaller enclosed units, and so, the time for these manipulations should be minimized as much as possible. Any sealed unit can be used for physiologic oxygen or low oxygen level culturing provided that adequate humidification, temperature, and carbon dioxide are provided.

In addition to oxygen, the other gases for culture typically are about 5% carbon dioxide and the remainder is nitrogen, but optionally may contain varying amounts of nitric oxide (starting as low as 3 ppm), carbon monoxide and other gases, both inert and biologically active. Carbon dioxide concentrations typically range around 5% as noted above, but may vary between 2-10%. Both nitric oxide and carbon monoxide are typically administered in very small amounts (*i.e.* in the ppm range), determined empirically or from the literature.

The optimal physiologic or low oxygen level conditions for any given cell type or any particular desired outcome will vary. A skilled artisan could determine

suitable subatmospheric conditions by generating an oxygen dose response curve, in which carbon dioxide is kept constant, and oxygen levels are varied (with nitrogen as the remaining gas). For example, to determine the optimal ambient oxygen culturing conditions for expansion of a CNS cell, one would establish cultures from an organ  
5 system. The initial culture is mixed, consisting of some differentiated cells, cells of other developmental lineages or pathways, as well as CNS cells. After exposure to the various oxygen levels (e.g. 1%, 2%, 5%, 10% and 15%), the number and function of CNS cells is assessed by methods appropriate to the system. In some cases, a constellation of molecular markers is available to rapidly identify the cell population.  
10 But in other cases, a single marker coupled with proliferation assays is appropriate, while in other cases proliferation assays alone are appropriate. In some cases all or some of the above assays are coupled with bioassays to follow the differentiation potential of the presumed stem cells. Overall, the precise assays used to determine stem cell and/or progenitor response to oxygen levels are dependent on the nature of  
15 the system examined as well as available markers and techniques specific to that system.

The timing of physiologic or low oxygen conditions is also part of the oxygen dose response curve. Some cells may be more or less sensitive to oxygen during  
isolation or immediately after isolation while some cells may respond only after some  
20 time in culture. The timing of physiologic or low oxygen conditions absolutely and in relation to other manipulations of the cultures is part of assessing the optimal oxygen culturing conditions. Furthermore, the mitogenic effects of other gases may be synergistic with physiologic or low oxygen conditions. Different gene regulatory  
25 networks may be induced by low/physiologic oxygen culturing during different phases of culture. During expansion of the cells, low oxygen may induce gene expression distinct from that induced by low oxygen during differentiation.

The cells are typically exposed to low oxygen level conditions for a time sufficient to enrich the population of progenitor/stem cells compared to other cell  
types. Typically this is for 1 or more hours, preferably 3 or more hours, more  
30 preferably 6 or more hours, and most preferably 12 or more hours, and may be continuous. The temperature during the culture is typically reflective of core body temperature, or about 37°C, but may vary between about 32°C and about 40°C. Other

important embodiments may simply achieve an increase in cell absolute number or promote the survival of cells.

Following an initial exposure to low or physiologic oxygen culturing conditions, cells can be maintained in these conditions or returned to normal laboratory oxygen conditions, depending on the desired outcome.

It is understood that the initial medium for isolating the CNS cells, the medium for proliferation of these cells, and the medium for differentiation of these cells can be the same or different. All can be used in conjunction with low or physiologic oxygen level culturing. The medium can be supplemented with a variety of growth factors, cytokines, serum, etc. Examples of suitable growth factors are basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factors (TGF $\alpha$  and TGF $\beta$ ), platelet derived growth factors (PDGFs), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF), insulin, erythropoietin (EPO), and colony stimulating factor (CSF). Examples of suitable hormone medium additives are estrogen, progesterone, testosterone or glucocorticoids such as dexamethasone. Examples of cytokine medium additives are interferons, interleukins, or tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). One skilled in the art will test additives and culture components at varied oxygen levels, as the oxygen level may alter cell response to, active lifetime of additives or other features affecting their bioactivity. In addition, the surface on which the cells are grown can be plated with a variety of substrates that contribute to survival, growth and/or differentiation of the cells. These substrates include but are not limited to laminin, poly-L-lysine, poly-D-lysine, polyornithine and fibronectin.

#### **Additional Factors for Promotion of Growth and Differentiation**

As described herein, the present invention provides methods of increasing the survival, differentiation and phenotypic integrity of CNS cells. This method generally involves growing these cells *in vitro* within physiological oxygen parameters. There is now a wealth of literature pointing to other factors that may increase the survival of such cells. It is contemplated that the use of some of these factors in combination with the growth conditions of the present invention will be useful.

Much of this interest has focussed on finding trophic factors. These factors are able to increase the survival of dopaminergic cells prepared for transplantation; maintain the *in situ* survival post-transplantation of embryonic neurons transplanted into the striatum; as well as increase graft volume, and thereby re-innervate a larger part of the caudate and putamen which has been shown to have effect both *in vitro* and *in vivo*.

Trophic factors such as NGF, bFGF, EGF, IGF I and II, TGF $\beta$ 1-3, PDGF, brain derived growth factor (BDNF), ganglion derived growth (GDNF), neurotrophin (NT)-3, NT-4, and ciliary neuronal trophic factor (CNTF), (Engele and Bohn, 1996; Mayer *et al.*, 1993a and 1993b; Knusel *et al.*, 1990, 1991; Poulsen *et al.*, 1994; Nikkhah *et al.*, 1993; Othberg *et al.*, 1995; Hyman *et al.*, 1991) have been investigated and shown to have pronounced effects *in vitro*.

MPTP and 6-OHDA lesions in primates are models of certain neurodegenerative disorders. It has been shown that the effects of such lesions can be reversed in primates and rats (Gash *et al.*, 1996) by the addition of NGF or bFGF to the cell suspension prior to grafting. The same factors also have been shown to increase graft survival, if added to the cell suspension prior to grafting (Chen *et al.*, 1996; Dunnett and Bjorkland, 1994). Additional studies showed an increased graft survival rate in transplanted neurons derived from a neural progenitor (CINP) cell line, that were retrovirally transduced with NGF (Martinez-Serrano *et al.*, 1995) and astrocytes transduced with BDNF (Yoshimoto *et al.*, 1995). GDNF has been shown to increase graft survival, extend fiber outgrowth and alleviate behavioral effects after 6-hydroxydopamine lesions in the striatum of rats (Sauer *et al.*, 1994; Bowenkamp *et al.*, 1995; Rosenblad *et al.*, 1996; Olson, 1996).

Thus these and other factors that may prolong the survival of the CNS cells either *in vitro* or *in vivo* are contemplated for use in the growth and maintenance conditions described in the present invention.

#### **Induction of differentiation with EPO at atmospheric O<sub>2</sub>**

In another embodiment, EPO can be used to mimic the lowered oxygen effect on dopaminergic differentiation. That is, EPO at atmospheric oxygen levels is used to promote differentiation of stem cells, CNS progenitor cells, or progeny thereof to

produce dopaminergic cells. Mesencephalic precursor cells are particularly preferred. The amount of EPO used in this embodiment is an amount sufficient to produce greater than at least about 10%, preferably 20%, more preferably 50% of dopaminergic cells. Preferably, saturating concentrations of EPO are added the culture either during proliferation, during differentiation or during both phases. The cultures are contacted with EPO for greater than at least about 1, preferably 2, more preferably 5 days. For example, a culture of CNS progenitor cells could be cultured in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (balance N<sub>2</sub>) for 5 days at saturating concentrations of EPO during the proliferative phase, and subsequently cultured for 3 days at 10% EPO during the differentiation phase. The atmosphere preferably contains 20% O<sub>2</sub>, although lower O<sub>2</sub> concentrations can be used.

### Transplantation Methods

Laboratory and clinical studies have shown the transplantation of cells into the CNS is a potentially significant alternative therapeutic modality for neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease (Wictorin *et al.*, 1990; Lindvall *et al.*, 1990; Sanberg *et al.*, 1994; Bjorklund and Stenevi, 1985; Freeman *et al.*, 1994). In some cases, transplanted neural tissue can survive and form connections with the CNS of the recipient, *i.e.* the host (Wictorin *et al.*, 1990). When successfully accepted by the host, the transplanted cells and/or tissue have been shown to ameliorate the behavioral deficits associated with the disorder (Sanberg *et al.*, 1994). The obligatory step for the success of this kind of treatment is to have enough viable cells available for the transplant. The physiologic/subatmospheric culturing conditions described herein can be used to differentiate specific populations of CNS cells useful for transplantation, and to expand the number of available CNS cells derived from a variety of culture systems.

In addition to cell cultures described above, fetal neural tissue is another important source for neural transplantation (Lindvall *et al.*, 1990; Bjorklund, 1992; Isacson *et al.*, 1986; Sanberg *et al.*, 1994). Other viable graft sources include adrenal cells and various cell types that secrete neural growth factors and trophic factors. The field of neural tissue transplantation as a productive treatment protocol for



neurodegenerative disorders has received much attention resulting in its progression to clinical trials. To date the major problem with this field has been the lack of ability to obtain enough viable cells. The present invention provides a method of maintaining such tissue in a state that will prevent them from losing their ability to serve as an appropriate graft for neurodegenerative diseases.

Methods of grafting cells are now well known to those of skill in art (U.S. Patent 5762926; U.S. Patent 5650148; U.S. Patent 5,082,670). Neural transplantation or grafting involves transplantation of cells into the central nervous system or into the ventricular cavities or subdurally onto the surface of a host brain. Conditions for successful transplantation include: 1) viability of the implant; 2) retention of the graft at the site of transplantation; and 3) minimum amount of pathological reaction at the site of transplantation.

Methods for transplanting various nerve tissues, for example embryonic brain tissue, into host brains have been described in Neural Grafting in the Mammalian CNS, Bjorklund and Stenevi, eds., (1985) Das, Ch. 3 pp. 23-30; Freed, Ch. 4, pp. 31-40; Stenevi *et al.*, Ch. 5, pp. 41-50; Brundin *et al.*, Ch. 6, pp. 51-60; David *et al.*, Ch. 7, pp. 61-70; Seiger, Ch. 8, pp. 71-77 (1985), incorporated by reference herein. These procedures include intraparenchymal transplantation, *i.e.* within the host brain (as compared to outside the brain or extraparenchymal transplantation) achieved by injection or deposition of tissue within the host brain so as to be opposed to the brain parenchyma at the time of transplantation (Das, *supra*).

The two main procedures for intraparenchymal transplantation are: 1) injecting the donor cells within the host brain parenchyma or 2) preparing a cavity by surgical means to expose the host brain parenchyma and then depositing the graft into the cavity (Das, *supra*). Both methods provide parenchymal apposition between the graft and host brain tissue at the time of grafting, and both facilitate anatomical integration between the graft and host brain tissue. This is of importance if it is required that the graft become an integral part of the host brain and to survive for the life of the host.

Alternatively, the graft may be placed in a ventricle, *e.g.* a cerebral ventricle or subdurally, *i.e.* on the surface of the host brain where it is separated from the host brain parenchyma by the intervening pia mater or arachnoid and pia mater. Grafting to



the ventricle may be accomplished by injection of the donor cells or by growing the cells in a substrate such as 3% collagen to form a plug of solid tissue which may then be implanted into the ventricle to prevent dislocation of the graft. For subdural grafting, the cells may be injected around the surface of the brain after making a slit in the dura. Injections into selected regions of the host brain may be made by drilling a hole and piercing the dura to permit the needle of a microsyringe to be inserted. The microsyringe is preferably mounted in a stereotaxic frame and three dimensional stereotaxic coordinates are selected for placing the needle into the desired location of the brain or spinal cord.

The donor cells may also be introduced into the putamen, nucleus basalis, hippocampus cortex, striatum or caudate regions of the brain, as well as the spinal cord.

For grafting, the cell suspension is drawn up into the syringe and administered to anesthetized graft recipients. Multiple injections may be made using this procedure. The age of the donor tissue, *i.e.*, the developmental stage, may affect the success of cell survival after grafting.

The cellular suspension procedure thus permits grafting of donor cells to any predetermined site in the brain or spinal cord, is relatively non-traumatic, allows multiple grafting simultaneously in several different sites or the same site using the same cell suspension, and permits mixtures of cells from different anatomical regions. Multiple grafts may consist of a mixture of cell types, and/or a mixture of transgenes inserted into the cells. Preferably from approximately  $10^4$  to approximately  $10^8$  cells are introduced per graft.

For transplantation into cavities, which may be preferred for spinal cord grafting, tissue is removed from regions close to the external surface of the CNS to form a transplantation cavity, for example by removing bone overlying the brain and stopping bleeding with a material such a gelfoam (Stenevi *et al.*, Brain Res. 114:1-20 (1976)). Suction may be used to create the cavity. The graft is then placed in the cavity. More than one transplant may be placed in the same cavity using injection of cells or solid tissue implants.

Grafting of donor cells into a traumatized brain will require different procedures, for example, the site of injury must be cleaned and bleeding stopped

before attempting to graft. In addition, the donor cells should possess sufficient growth potential to fill any lesion or cavity in the host brain to prevent isolation of the graft in the pathological environment of the traumatized brain.

### Measurement of Phenotype of Cells

5 In specific embodiments, it may be necessary to monitor the phenotype of the cell that has been grown in the subatmospheric oxygen conditions so as to determine whether differentiation or other modification of the cell has occurred. Various methods may be used to achieve this, including monitoring message level, protein level, subcellular localization, functional assays or morphological changes. The methods for monitoring message level include PCR™ (U.S. Patent 5,364,790; U.S. Patent 4,800,159; U.S. Patent 4,683,195), In situ hybridization (U.S. Patent 4,883,278; U.S. Patent 4,886,741; U.S. Patent 5,506,098; U.S. Patent 5,225,326; U.S. Patent 5,521,061; U.S. Patent 5,538,869; U.S. Patent 5,665,540), RNase protection assay, and single cell PCR™. The methods for monitoring protein level may use antibody staining, HPLC, western blotting or immunoprecipitation. These techniques are all well known to those of skill in the art.

15 The ability to detect genes that are differentially expressed in two cell types or populations combined with advances of rapid gene detection and sequencing technologies may be used to compare gene expression in cells cultured under varying oxygen concentrations.

20 Methods of differential display have been used to elucidate the genes responsible for a difference in phenotypes between two relatively similar cell types or during sequential changes of a cell from one state to another. For example, using the differential display technique, Kocher *et al.* (1995) selected for genes that were up-regulated in renal cell carcinoma compared with normal renal parenchyma. Through this method, Kocher *et al.* (1995) were able to isolate a gene (DD96) that was rarely expressed in normal epithelial cell populations, expressed diffusely in malignant epithelial cells of the wide majority of carcinomas, and markedly overexpressed in carcinomas originating from the colon, breast, and lung. A similar technique can be used to compare gene expression in cells incubated under traditional versus low oxygen level conditions. Genes up-regulated in one population over the other then

may be used as a probe to screen for expression of that gene in other cell populations or the same cell population under different culturing conditions (*i.e.*, in the presence of compounds or environmental stimuli that may affect the expression of the gene).

5 Kang *et al.* (1998) have developed a reciprocal subtraction differential RNA display (RSDD) method that permits the rapid and efficient identification and cloning of both abundant and rare differentially expressed genes. The technology was used to analyze gene expression alterations resulting during cancer progression as adenovirus-transformed rodent cells developed an aggressive transformed state (Kang *et al.*, 1998). The approach resulted in the identification and cloning of known and  
10 unknown sequences that displayed expression as a function of progression and suppressed expression as a function of progression (Kang *et al.*, 1998). The RSDD technique may be used to compare gene expression between cells during maintenance, proliferation and/or differentiation of the cells from progenitor or stem cells to fully differentiated cells in room air versus subatmospheric conditions.

15 The methods of differential display may be used in conjunction with rapid DNA sequencing and detection methods, allowing for the ability to screen for or sequence a large number of genes in a relatively short amount of time. U.S. Patent No. 5,800,992 provides methods for detecting the differential expression of a plurality of genes between two cell types using complimentary polynucleotides in an array.  
20 Such technology is commonly referred to as "DNA chip" technology because the polynucleotides are deposited on a substrate that resemble computer microprocessor chips. Also described are methods of sequencing genes using DNA chips.

25 Additionally, similar techniques are described in U.S. Patent No. 5,834,181 which utilizes similar technology to detect minor alterations in genes such as single nucleotide substitution, allowing detection of mutations in genes that lead to a change in the phenotype of a cell.

30 Single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, also will be useful in monitoring the phenotype of the cells grown in the present invention. Such a technique is described by, for example, Cornelison and Wold (1997).

The single cell RT-PCR technique of Cornelison and Wold allows determination of expression of a number of genes at one time and may be used to

identify skeletal muscle satellite cells and determine their activation state when incubated in the low/physiological oxygen conditions of the present invention.

Another detection method commonly used is an RNase protection assay in which a radiolabeled RNA probe is mixed with a test RNA population, such as total cellular RNA from an individual, under conditions where complementary segments of the RNA probe and the test RNA will hybridize. RNase is then added to the mixture to destroy unprotected (unhybridized), single-stranded probe and test RNA. When all single-stranded RNA has been destroyed, only short fragments of protected RNA remains that can be analyzed electrophoretically to diagnose the particular RNA composition of the test RNA. The protected double-stranded RNA fragments are denatured before analysis, to make available the detectable, labeled single stranded RNA probe fragment.

### Disease Models

Once a particular set of cells have been generated it will of course be necessary to test that these cells would apply to a disease model. Animal models of Parkinson's Disease and other neurodegenerative diseases are now well known to those of skill in the art.

For example, a rat model of Parkinson's disease can be created by giving a unilateral injection of saline-ascorbate 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) into the medial forebrain bundle. This produces a lesion that ultimately mimics Parkinsonian behavior. Completeness of the lesion produced can be monitored either by apomorphine or amphetamine induced rotational behavior (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Animals turning at a rate of more than 7 turns per minute (Schmidt *et al.*, 1982) can be inferred to have the appropriate lesion (at least 7 contralateral rotations/min following apomorphine administration and at least 7 ipsilateral rotations/min towards the side of the lesion following amphetamine administration).

Using such a model a baseline rotation behavior can be established. After that, the cells grown in the present invention can then be transplanted into the rat model as described herein above. Any decrease in the rotational behavior would be indicative of the cellular transplant having an appropriate therapeutic value.

### Gene Replacement/Augmentation Applications

Optionally, the CNS cells obtained using the method of the present invention can be manipulated to express desired gene products. Gene therapy can be used to either modify a cell to replace a gene product, to facilitate regeneration of tissue, to treat disease, or to improve survival of the cells following implantation into a patient (*i.e.* prevent rejection).

In this embodiment, the CNS cells are transfected prior to expansion and differentiation. Techniques for transfecting cells are known in the art.

A skilled artisan could envision a multitude of genes which would convey beneficial properties to the transfected cell or, more indirectly, to the recipient patient/animal. The added gene may ultimately remain in the recipient cell and all its progeny, or may only remain transiently, depending on the embodiment. For example, genes encoding tyrosine hydroxylase, or a monoamine transporter such as VMAT 1 or VMAT 2 could be transfected into certain CNS cells to provide an appropriate therapeutic cell suitable for grafting into a subject with Parkinson's disease. Other genes that could be used include GABA-decarboxylase, enkephalin, dopa decarboxylase (AADC), ciliary neuronal trophic factor (CNTF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin (NT)-3, NT-4, and basic fibroblast growth factor (bFGF). In some situations, it may be desirable to transfect the cell with more than one gene. Of course the above therapeutic genes are only exemplary and those of skill in the art will understand that any neurodegenerative disorder that results from an aberration in gene expression and/or function can be treated by gene replacement and/or augmentation. Such disorders and their related genes are well known to those of skill in the art.

In some instances, it is desirable to have the gene product secreted. In such cases, the gene product preferably contains a secretory signal sequence that facilitates secretion of the protein.

The viral vectors used herein may be adenoviral (U.S. Patent No. 5,824,544; U.S. Patent No. 5,707,618; U.S. Patent No. 5,693,509; U.S. Patent No. 5,670,488; U.S. Patent No. 5,585,362; each incorporated herein by reference), retroviral (U.S.

Patent No. 5,888,502; U.S. Patent No. 5,830,725; U.S. Patent No. 5,770,414; U.S. Patent No. 5,686,278; U.S. Patent No. 4,861,719 each incorporated herein by reference), an adeno-associated viral (U.S. Patent No. 5,474,935; U.S. Patent No. 5,139,941; U.S. Patent No. 5,622,856; U.S. Patent No. 5,658,776; U.S. Patent No. 5,773,289; U.S. Patent No. 5,789,390; U.S. Patent No. 5,834,441; U.S. Patent No. 5,863,541; U.S. Patent No. 5,851,521; U.S. Patent No. 5,252,479; each incorporated herein by reference), an adenoviral-adenoassociated viral hybrid (U.S. Patent No. 5,856,152 incorporated herein by reference), a lentiviral vector, a vaccinia viral or a herpesviral (U.S. Patent No. 5,879,934; U.S. Patent No. 5,849,571; U.S. Patent No. 5,830,727; U.S. Patent No. 5,661,033; U.S. Patent No. 5,328,688; each incorporated herein by reference) vector.

Delivery of the expression constructs through non-viral vectors also is contemplated. Such delivery may employ microinjection (U.S. Patent No. 5,612,205), electroporation (U.S. Patent No. 5,507,724; U.S. Patent No. 5,869,326; U.S. Patent No. 5,824,547; U.S. Patent No. 5,789,213; U.S. Patent No. 5,749,847; U.S. Patent No. 5,019,034; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984), calcium phosphate coprecipitation (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990), DEAE dextran introduction (Gopal, 1985), receptor mediated introduction (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988), liposome mediated introduction (U.S. Patent No. 5,631,018; U.S. Patent No. 5,620,689; U.S. Patent No. 5,861,314; U.S. Patent No. 5,855,910; U.S. Patent No. 5,851,818; U.S. Patent No. 5,827,703, U.S. Patent No. 5,785,987; Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979), dendrimer technology (U.S. Patent 5,795,581; U.S. Patent 5,714,166; U.S. Patent 5,661,025), naked DNA injection (Harland and Weintraub, 1985) and particle bombardment (U.S. Patent No. 5,836,905; U.S. Patent No. 5,120,657; Yang *et al.*, 1990).

The desired gene is usually operably linked to its own promoter or to a foreign promoter which, in either case, mediates transcription of the gene product. Promoters are chosen based on their ability to drive expression in restricted or in general tissue types, or on the level of expression they promote, or how they respond to added chemicals, drugs or hormones. Particularly contemplated promoters include but are not limited to CMV IE, SV40 IE,  $\beta$ -actin, collagen promoter, TH promoter, AADC promoter and the nestin promoter.



Other genetic regulatory sequences that alter expression of a gene may be co-transfected. In some embodiments, the host cell DNA may provide the promoter and/or additional regulatory sequences.

Other elements that can enhance expression can also be included such as an enhancer or a system that results in high levels of expression.

Methods of targeting genes in mammalian cells are well known to those of skill in the art (U.S. Patent Nos. 5,830,698; 5,789,215; 5,721,367 and 5,612,205). By "targeting genes" it is meant that the entire or a portion of a gene residing in the chromosome of a cell is replaced by a heterologous nucleotide fragment. The fragment may contain primary the targeted gene sequence with specific mutations to the gene or may contain a second gene. The second gene may be operably linked to a promoter or may be dependent for transcription on a promoter contained within the genome of the cell. In a preferred embodiment, the second gene confers resistance to a compound that is toxic to cells lacking the gene. Such genes are typically referred to as antibiotic-resistance genes. Cells containing the gene may then be selected for by culturing the cells in the presence of the toxic compound.

### **Application to Other Cell Types**

Although the majority of the discussion above is focussed on the growth and culturing of CNS cells, it should be appreciated that techniques of the present invention also will be useful for growth of other types of cells. As such it is contemplated that the techniques provided herein will be useful for growing any cells that are routinely used in transplant therapies. For example, such cells may be islets cells for diabetes; myoblasts for muscular dystrophy; hepatocytes for liver disease; skin grafts for wound healing and/or burns, and bone marrow or stem cells for hematopoietic and genetic disorders. In addition, the disclosure of U.S. Application number 09/195,569 filed November 18, 1998, (specifically incorporated herein by reference) will provide additional examples that may be useful in conjunction with the present invention.



## Examples

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

### Example 1

#### Material and Methods

**Culture of CNS Stem Cells.** Animals were housed and treated following NIH guidelines. Cells dissected from rat embryonic lateral ganglionic eminence (E14) or mesencephalon (E12) were mechanically dissociated, plated on plastic 24-well plates (Costar) or 12 mm glass cover slips (Carolina Biologicals) precoated with polyornithine/fibronectin, and grown in defined medium with bFGF (Studer *et al.*, 1998; Johe *et al.*, 1996). In general, bFGF was withdrawn from the medium after 4 - 6 days of culture. Clonal assays were carried out in plastic 48-well plates (Costar). In some studies, recombinant human (rh)EPO, rhVEGF<sub>165</sub> or recombinant mouse (rm)FGF8b, or their neutralizing antibodies (all from R&D Systems) were added to cultures at the following concentrations: EPO 0.5 U/ml, EPO neutralizing antibody 10 µg/ml, FGF8 250 ng/ml, FGF8b neutralizing antibody 5 µg/ml, VEGF 50 ng/ml, VEGF neutralizing antibody 0.5 µg/ml. Dose response for EPO was carried out at 0.05 U/ml, 0.5 U/ml, 5 U/ml and 15 U/ml; for anti-EPO at 10 µg/ml and 100 µg/ml. Results of all experiments were confirmed by at least 2 independent culture series.

**Low oxygen culture.** Cultures were placed in humidified portable isolation chambers (Billups-Rothenberg, Del Mar CA), flushed daily with a gas mixture 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> + 94% N<sub>2</sub>. Precise O<sub>2</sub> levels in the surrounding atmosphere depended on the length of chamber flush (90 sec at 15 L/min achieved 6% O<sub>2</sub>, 6 minutes of flush

achieved 1.5% O<sub>2</sub>), which was not standardized until availability of an O<sub>2</sub>-sensitive electrode system (OS2000, Animus Corp., Frazer PA). Thus "lowered O<sub>2</sub>" conditions represent a range of ambient O<sub>2</sub> of 3±2%, which approximates normal brain tissue levels (Table 1). The entire chamber was housed in an incubator to maintain temperature at 37°C.

***BrdU uptake and TUNEL analysis.*** Bromodeoxyuridine (10 µM) was added to cultures for exactly 60 minutes, just prior to fixation. Anti-BrdU staining was performed according to the manufacturer's protocol (Amersham Life Sciences). The TUNEL reaction (Boehringer-Mannheim) was also performed according to manufacturer's protocol. TUNEL+ cells were visualized by metal-enhanced DAB reaction (Pierce) after peroxidase conversion of the FITC label.

***Immunohistochemistry.*** Cells were fixed in 4% paraformaldehyde + 0.15% picric acid/PBS. Standard immunohistochemical protocols were followed. The following antibodies were used: Stem cell/progenitor characterization: Nestin polyclonal #130 1:500 (Martha Marvin & Ron McKay), PSA-NCAM, En1 and FP4 (all monoclonal 1:2, Developmental Studies Hybridoma Bank, provided by Tom Jessel). Stem cell differentiation: β-tubulin type III (Tuj1) monoclonal 1:500 and polyclonal 1:500 (both BabCO), O4 monoclonal 1:5 (Boehringer-Mannheim), galactocerebroside (GalC) monoclonal 1:50 (Boehringer-Mannheim), glial fibrillary acidic protein (GFAP) 1:100 (ICN Biochemicals). Neuronal subtype differentiation: Tyrosine hydroxylase (TH) polyclonal 1:200-1:500 (PelFreeze, Rogers AK) or monoclonal 1:2000 (Sigma), GABA polyclonal 1:500 (Sigma), glutamate 1:500 (Sigma), dopamine-β-hydroxylase (DBH) 1:100 (Protos Biotech Corp). Appropriate fluorescence-tagged (Jackson ImmunoResearch) or biotinylated (Vector Laboratories) secondary antibodies followed by metal-enhanced DAB reaction (Pierce) were used for visualization.

***Cell Counts and Statistical Procedures.*** Uniform random sampling procedures were used for cell counts and quantified using the fractionator technique (Gundersen, *et al.*, 1988). Statistical comparisons were made by ANOVA with posthoc Dunnett test when more than 2 groups were involved. If data were not

normally distributed, a non-parametric test (Mann-Whitney U) was used to compare lowered vs. 20% O<sub>2</sub> results. Data are expressed as mean  $\pm$ SEM.

**Reverse-phase HPLC determinations of dopamine content.** Culture supernatants of medium, HBSS, and HBSS+56 mM KCl were stabilized with orthophosphoric acid and metabisulfite, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Stabilization, aluminum adsorption, equipment, and elution of dopamine have been previously described (Studer *et al.*, 1998; Studer *et al.*, 1996). Results were normalized against dopamine standards at varying flow rates and sensitivities.

**Western blots.** Cell pellets were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pellet was lysed in 20 mM Hepes, pH 7.6, 20% glycerol, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.1% Triton-X-100, with protease inhibitors (Complete, Boehringer-Mannheim), homogenized, and incubated on ice for 1 hr. After centrifugation, supernatant protein concentration was assayed by BCA (Pierce). For western, block was 5% milk in TBST, primary TH antibody (Pel-Freeze, Rogers, AK) was used at 1:500, and secondary was HRP-conjugated goat anti-rabbit (Pierce) at 1:5000. Signal was detected with SuperSignal (Pierce).

**RT-PCR™.** Cultures were washed once in PBS before solubilization in 2 ml (per 6 cm dish) Trizol (Life Technologies) then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . RNA extraction was carried out according to manufacturer's recommendations (Gibco Life Technologies). The Superscript kit (Gibco Life Technologies) was used for reverse transcription of 10  $\mu\text{g}$  RNA per condition. PCR conditions were optimized by varying MgCl concentration and cycle number to determine linear amplification range. Amplification products were identified by size and confirmed by DNA sequencing. TH was kindly provided by Vera Vikodem, NIDDK, 30 cyc.,  $56^{\circ}\text{C}$ , 300bp. For the other products the primer sequences, cycle numbers, and annealing temperatures were as shown in Table 2.

Table 2: primer sequences, cycle numbers, and annealing temperatures for PCR

Identity	Forward primer	Reverse primer	Conditions
<b>GAPDH</b>	CTCGTCTCATAGACAAAGATGGTGAAG (SEQ ID NO:1)	AGACTCCACGACATACACTCAGCACC (SEQ ID NO:2)	28 cyc., 59°C, 305bp
<b>VHL</b>	CCTCTCAGGTCATCTTCTGCAACC (SEQ ID NO:3)	AGGGATGGCACAACAGTTCC (SEQ ID NO:4)	35 cyc., 60°C, 208bp
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	GCAGCACGATCTCGGCGAAGCAA (SEQ ID NO:5)	GCACCATAACAAGCCATCCAGGG (SEQ ID NO:6)	30 cyc., 59°C, 235bp
<b>EPO</b>	CGCTCCCCACGCCCTCATTTG (SEQ ID NO:7)	AGCGGCTTGGGTGGCGTCTGGA (SEQ ID NO:8)	30cyc., 60°C, 385 bp
<b>VEGF</b>	GTGCACTGGACCCCTGGCTTTACT (SEQ ID NO:9)	CGCCTTGCAACGCGAGTCTGTGTT (SEQ ID NO:10)	30 cycles, 60°C, 474bp (detects VEGF-1, VEGF-2 AND VEGF-3)
<b>Nurr1</b>	TGAAGAGAGCGGAGAAGGAGATC (SEQ ID NO:11)	TCTGGAGTTAAGAAATCGGAGCTG (SEQ ID NO:12)	30 cyc., 55°C, 255 bp
<b>Ptx3</b>	CGTGCGTGGTTGGTTCAAGAAC (SEQ ID NO:13)	GCGGTGAGAAATACAGGTTGTGAAG (SEQ ID NO:14)	35 cyc., 60°C, 257 Bp
<b>SHH</b>	GGAAGATCACAAGAACTCCGAAC (SEQ ID NO:15)	GGATGCGAGCTTTGGATTTCATAG (SEQ ID NO:16)	30 cyc., 59°C, 354bp
<b>FGF8</b>	CATGTGAGGGACCAGAGCC (SEQ ID NO:17)	GTAGTTGTTCTCCAGCAGGATC (SEQ ID NO:18)	35 cyc., 60°C, 312bp
<b>En1</b>	TCAAGACTGACTACAGCAACCCC (SEQ ID NO:19)	CTTTGTCTGAACCGTGGTGGTAG (SEQ ID NO:20)	30 cyc., 60°C, 381bp
<b>FGFR3</b>	ATCCTCGGAGATGACGAAGAC (SEQ ID NO:21)	GGATGCTGCCAAACTTGTCTC (SEQ ID NO:22)	30 cyc., 55°C, 326 bp
<b>GDNF</b>	according to Moreau <i>et al.</i> , 1998		
<b>BDNF</b>	GTGACAGTATTAGCGAGTGGG (SEQ ID NO:23)	GGGTAGTTCGGCATTGC (SEQ ID NO:24)	35 cycles, 56°C, 213 bp

### Example 2

#### **Results: Lowered O<sub>2</sub> augments expansion of striatal and mesencephalic precursors.**

5 E14 rat striatum, widely used for derivation of CNS precursors, cultured in lowered O<sub>2</sub> yielded an average 2- to 3-fold more cells than 20% O<sub>2</sub> cultures over a wide range of plating densities in the presence of bFGF. (Basic FGF acts as mitogen for stem cells obtained from many regions of the developing brain. The withdrawal of bFGF initiates differentiation to neurons, astrocytes and oligodendrocytes). (FIG. 1).  
10 Identical results were obtained with E12 mesencephalic precursors. For all results, data were verified by at least two independent culture series.

*Effects on cell proliferation and cell death.* To test whether increased cell yield in lowered O<sub>2</sub> is due to increased proliferation, reduced cell death, or both,  
15 precursors were pulsed with bromodeoxyuridine (BrdU) for 1 hr immediately before fixation at multiple time points while precursor cells were proliferating or differentiating. Both mesencephalic and striatal precursors showed increased BrdU labeling indices when grown in lowered O<sub>2</sub> as compared to traditional cultures. Lowered O<sub>2</sub> increased the BrdU labeling index in the presence of bFGF and during  
20 cell differentiation following mitogen withdrawal from mesencephalic precursors (FIG. 2). BrdU incorporation rates for striatal precursors showed similar patterns {*Day 2 of expansion* :  $18 \pm 6\%$  in lowered O<sub>2</sub> vs.  $11 \pm 6\%$  in 20% O<sub>2</sub> (n=24, p < 0.05). *Day 6 of expansion* :  $30 \pm 8\%$  in lowered O<sub>2</sub> vs.  $22 \pm 5\%$  in 20% O<sub>2</sub> (n=24, p < 0.05). *Day 4 of differentiation (10 days in vitro)* :  $12 \pm 5\%$  in lowered O<sub>2</sub> vs.  $3 \pm$   
25  $3\%$  in 20% O<sub>2</sub> (n=24, p < 0.05)}.

In addition to this apparent increase in cell proliferation in lowered O<sub>2</sub> cultures, precursor cells were also less likely to undergo apoptosis than CNS precursors grown in 20% O<sub>2</sub>. Both mesencephalic and striatal precursors revealed significantly reduced percentages of TUNEL-positive cells both during expansion and  
30 after bFGF withdrawal. TUNEL data for mesencephalic precursors are summarized in FIG. 3. Thus, both reduced apoptosis and increased cell proliferation contribute to

elevated yield of cells at the end of the expansion phase. Cell death is reduced but not entirely eliminated during the differentiation phase by lowering the O<sub>2</sub> levels.

**Cell lineage and clonal growth.** A series of molecular markers were used, together with morphologic assessment in order to characterize how lowered O<sub>2</sub> culturing affects the choice of differentiation pathways and the kinetics of differentiation. Immunoreactivity for the intermediate filament nestin was used to discriminate CNS stem and progenitor cells from more differentiated progeny (Lendahl *et al.*, 1990). Six days after bFGF withdrawal the percentage of nestin-positive cells derived from expanded precursors was grossly reduced in lowered O<sub>2</sub> cultures compared with 20% O<sub>2</sub> cultures, suggesting that differentiation might have been accelerated in lowered O<sub>2</sub> (FIG. 4A and FIG. 6). The sialic acid substituted form of NCAM (PSA-NCAM), a proposed marker for committed neuronal progenitors (Mayer *et al.*, 1997), was conversely reduced in differentiated lowered O<sub>2</sub> cultures (FIG. 6). The idea of accelerated progression to a more differentiated phenotype was supported by the earlier appearance of neuronal and glial markers in lowered O<sub>2</sub>. Neurons were assessed by  $\beta$ -tubulin III (TUBJ1) staining, astrocytes by glial fibrillary acidic protein (GFAP), oligodendrocyte precursors by O4, and oligodendrocytes by GalC galactocerebroside staining (FIG. 4). Five days after bFGF withdrawal striatal cultures held at low O<sub>2</sub> contained 46% Tuj1-positive cells vs. 34% in 20% O<sub>2</sub> (n=12, p < 0.05); Six percent were GFAP+ vs. 2% in 20% O<sub>2</sub> (n=12, p < 0.05); and 4% were Gal-C+ vs. 5% in 20% O<sub>2</sub> (p=n.s.). In mesencephalic cultures held at lowered oxygen, 73% were Tuj1+ vs. 63% in 20% O<sub>2</sub> (n=12, p = 0.06); no GFAP+ cells were detected in either oxygen conditions; 1% were O4+ versus 0% in 20% O<sub>2</sub> (n=12, p < 0.01). (FIG. 4B).

To investigate O<sub>2</sub> effects at clonal densities, mesencephalic precursors were first expanded in bFGF for 6 days in 20% O<sub>2</sub>, replated at a density of 1-5 cells/well, then maintained at either lowered or 20% O<sub>2</sub>. After 20 days, 20 ng/mL bFGF was withdrawn. Clonal cultures with typical multi-lineage differentiation responses were observed in both lowered and 20% O<sub>2</sub> conditions. FIG. 4C illustrates a typical nestin+ clone (left panel) and clonally derived cells undergoing neuronal differentiation 4 days after mitogen withdrawal (right panel). As expected of stem cells, all three



lineages were represented in the clones grown in low oxygen conditions. However, the efficiency of clone formation was 3 times higher in lowered O<sub>2</sub> and the average clone size also increased from <50 cells in 20% O<sub>2</sub> to 50-500 cells in lowered O<sub>2</sub> (FIG. 4D, FIG. 4E).

### Example 3

#### Results: Neuronal subtype differentiation

The results above establish that lowered oxygen conditions support stem cell proliferation and differentiation to neurons and glia. The inventors' previous work has shown that nestin-positive mesencephalic precursors differentiate into functional dopaminergic neurons (Studer *et al.*, 1998). Next it was determined whether this specific neuronal fate was influenced by lowered O<sub>2</sub>. Mesencephalic precursors in lowered oxygen displayed a striking increase in both the absolute number and fraction of neurons expressing TH (FIG. 5A, FIG. 5B). In lowered O<sub>2</sub>, large neuronal clusters were seen in which virtually all neurons were TH+. On average, 56% of neurons (marked by Tuj1 staining) generated in lowered O<sub>2</sub> were TH+ vs. 18% in traditional cultures (n=12, p < 0.001). Increased TH-immunoreactivity in lowered O<sub>2</sub> cultures correlated with increased TH protein content in Western blots (FIG. 5C). The functional dopaminergic capacity of the TH-positive neurons was further assessed by reverse phase HPLC, which showed significantly increased levels of dopamine in lowered vs. 20% O<sub>2</sub> cultures (FIG. 5D): Conditioned medium (24 hours) showed a 5-fold increase in dopamine (n=5, p < 0.01). Basal release in HBSS revealed a 2- to 3-fold increase (n=5, p < 0.05) and evoked release was 3-fold increased (n=5, p < 0.05). These results confirm that lowered oxygen favors the differentiation of functional dopaminergic neurons.

Mesencephalic precursors give rise to neurons with several distinct neurotransmitter phenotypes in addition to dopaminergic fate (Studer *et al.*, 1998). Interestingly, the percentage of serotonergic neurons was also increased in lowered O<sub>2</sub>, 3.2±1.2% vs. 1.2±0.3% in 20% O<sub>2</sub> (n=12, p < 0.05, FIG. 6). On the other hand GABA+ and Glutamate+ neurons were less likely to be generated in lowered O<sub>2</sub> (FIG. 6: GABA+ cells 6.6±1.8% in lowered O<sub>2</sub> vs. 10.4±1.5% n=12, p < 0.05; Glutamate+

cells  $12.8\% \pm 3.8\%$  in lowered  $O_2$  cultures vs.  $23.6\% \pm 4.0\%$  in 20%  $O_2$  ( $n=12$ ,  $p < 0.01$ ). No double labeling of TH with GABA was detected indicating that TH immunoreactivity corresponded to differentiated dopaminergic neurons and was not a transient developmental phenomenon seen in developing GABAergic neurons (Max *et al.*, 1996). Furthermore, the TH-positive neurons were not fated to a noradrenergic phenotype, since no dopamine- $\beta$ -hydroxylase staining could be demonstrated.

Since lowered  $O_2$  promoted differentiation of dopaminergic and serotonergic neurons, both ventral neuronal phenotypes (Yamada *et al.*, 1991; Hynes *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 1998), it was determined whether these changes were associated with an increase in floor plate cells. Immunohistochemistry revealed expanded zones of FP4+ cells in lowered  $O_2$  (FIG. 6). A more striking feature was the increased occurrence of neurons expressing the transcription factor engrailed-1 (En1) in lowered  $O_2$ . (FIG. 6). Engrailed-1 is critical for normal midbrain development (Joyner, 1996; Danelian and McMahon 1996; Wurst *et al.*, 1994) and has been implicated in control of dopaminergic neuronal fate (Simone *et al.*, 1998).

It is important to establish whether the low oxygen condition enhanced dopaminergic differentiation by acting during the proliferation or differentiation phases of the culture system. Mesencephalic precursors were expanded for 5 days in either lowered or 20%  $O_2$ . Each group was then subdivided for differentiation in either lowered or 20%  $O_2$ . Precursors expanded in lowered  $O_2$  but differentiated in 20%  $O_2$  yielded  $38\% \pm 6\%$  TH+ neurons, similar to those maintained in lowered  $O_2$  throughout ( $41\% \pm 7\%$ ,  $n=12$ ,  $p = n.s.$ ) but significantly higher than those maintained in 20%  $O_2$  throughout ( $17\% \pm 4\%$ ,  $n=12$ ,  $p < 0.01$ ). Exposure to lowered  $O_2$  limited to the differentiation phase did not significantly increase the yield of dopaminergic neurons ( $21\% \pm 2\%$ ,  $n=12$ ,  $p=n.s.$ ) compared to cultures maintained in 20%  $O_2$  throughout. From these data, it is shown that the major effect of low  $O_2$  is during the expansion phase.

Semi-quantitative RT-PCR was used to assay RNA from cultures at various time points for differential expression of candidate genes involved in dopaminergic neuron development (FIG. 7). A small increase in TH message was detected from lowered  $O_2$  cultures after differentiation, compared to 20%  $O_2$ . The Ptx3 homeobox gene has also been implicated in dopamine neuron development (Smidt *et al.*, 1997)

and was also expressed at increased levels in lowered O<sub>2</sub> suggesting that these conditions promoted the dopaminergic phenotype, not simply upregulation of TH gene expression. Strong evidence links sonic hedgehog (Echelard *et al.*, 1993); and Nurr1 (Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998) genes to the differentiation of midbrain dopaminergic neurons but no O<sub>2</sub>-dependent changes in expression were detected. However, engrailed-1 was upregulated in lowered O<sub>2</sub>, paralleling the immunohistochemical results (FIG. 6). Fibroblast growth factor 8b (FGF8b) message was dramatically upregulated in lowered O<sub>2</sub>, by the end of the expansion phase. Messages for other regulators of dopaminergic differentiation did not differ significantly between O<sub>2</sub> conditions.

#### Example 4

##### **Discussion: Lowered oxygen cultures favor proliferation and survival of CNS stem cells.**

Standard conditions for the culture of mammalian cells are 37°C in a gas atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Thus ambient temperature is adjusted to reflect core mammalian body temperature and CO<sub>2</sub> is adjusted to reflect approximate venous concentrations, while in striking contrast, O<sub>2</sub> levels in culture are not adjusted to reflect physiologic levels. At sea level, unhumidified room air contains 21% O<sub>2</sub>, and a 95% air/5% CO<sub>2</sub> mixture contains 20% O<sub>2</sub>. Alveolar air contains 14% O<sub>2</sub>, arterial O<sub>2</sub> concentration is 12%, venous O<sub>2</sub> levels are 5.3%, and mean tissue intracellular O<sub>2</sub> concentration is 3% (Guyton, and Hall, 1996). Directly relating to this study, mean brain O<sub>2</sub> in the adult rat and in fetal sheep have both been measured at 1.6% (Silver and Erecinska, 1988; Koos and Power, 1987). Physiological tissue O<sub>2</sub> levels in some brain regions are even lower (Table 1). In this work the impact of lowered, more physiologic oxygen levels on CNS stem cell culture was analyzed and showed four major effects: 1) increased proliferation of progenitors; 2) reduced apoptosis; 3) accelerated progression to differentiated states; and 4) elevated absolute number and proportion of TH<sup>+</sup> neurons.

Lowered O<sub>2</sub> culturing consistently enhanced proliferation of CNS stem cells. A 2- to 4-fold increase in cell number was observed during the proliferation phase

when most of the cells are nestin+ precursors. This increase in cell number was also maintained after mitogen withdrawal when proliferation was vastly reduced and differentiation takes place. Although more cells were present in differentiated cultures in lowered O<sub>2</sub>, the proportions of neurons and glia were similar in the two culture conditions. In neural tissue, there is one supporting, though specialized, precedent for mitogenic activity of lowered O<sub>2</sub> in neural crest-derived carotid body chromaffin cells (Nurse and Vollmer, 1997). These dopaminergic glomus cells are functionally specialized O<sub>2</sub>-sensitive chemoreceptors, and so would be expected to be specifically responsive to changes in O<sub>2</sub> levels in the artery. The present results show that lowered oxygen enhances the proliferation and survival of CNS stem cells.

Two specific signaling pathways, FGF8 and EPO, were identified as candidates for significant roles in the lowered O<sub>2</sub> response and showed that each can recapitulate part of the lowered O<sub>2</sub> phenotype at 20% O<sub>2</sub>. Lowered O<sub>2</sub> culturing led to relative increases in RNAs encoding erythropoietin and FGF8. In early midbrain development, FGF8 functions as a mitogen (Danelian and McMahon 1996), but significant mitogenic or trophic effects of FGF8 on CNS stem cell cultures have not been reported. Here, the increased cell yield from mesencephalic precursors maintained in 20% O<sub>2</sub> and exposed to 250 ng/ml FGF8 partly recapitulated the proliferation/trophic effects of lowered O<sub>2</sub>, with a 30% increase in total number compared to a 200-400% increase in lowered O<sub>2</sub>. In addition to increased proliferation, less apoptosis occurs in CNS stem cells cultured in lowered O<sub>2</sub>. There is a potential toxic role for reactive oxygen intermediates (ROI) produced in room air cultures. However, it cannot simply be assumed that 20% O<sub>2</sub> cultures generate more oxidative stress than lowered O<sub>2</sub> cultures, since free radicals are generated in ischemic conditions (Perez Velazquez *et al.*, 1997).

In contrast to the increased cell number seen in lowered O<sub>2</sub>, only minor effects were detected on the final ratio of neurons to astrocytes to oligodendrocytes that were derived from expanded striatal or mesencephalic precursors. This result together with clonal analysis confirms that the nestin+ precursors expanded in lowered oxygen have stem cell properties.

### Example 5

#### Discussion: Dopaminergic commitment and differentiation.

There is a great deal of evidence that CNS stem cells can give rise to multiple neuron types (Johe *et al.*, 1996; Gritti *et al.*, 1996; Kalyani *et al.*, 1998). For several years the midbrain has been studied as model for neuron subtype specification (Hynes *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1995; (reviewed in Hynes and Rosenthal, 1999). Recently, conditions have been established that allow midbrain precursor cells to proliferate and differentiate to dopaminergic neurons *in vitro* (Studer *et al.*, 1998). In contrast to primary rat fetal mesencephalic cultures where only 5% of the neurons are immunoreactive for TH, this number was increased to 24% of neurons in dissociated precursor cultures from E12 mesencephalon. Here it is shown that 56% of neurons generated from mesencephalic precursors are TH+, and this finding is associated with increased dopamine production by HPLC. Serotonergic neurons, another ventral neuron type found in this region of the brain, were also generated in increased numbers in lowered O<sub>2</sub>. In contrast the number of GABAergic and Glutamatergic neurons were reduced. The lowered oxygen conditions were most effective in generating dopaminergic neurons during the phase of precursor cell expansion. These results suggest that lowered oxygen conditions enhance the production of ventral fates by a mechanism that acts prior to differentiation.

Transcript levels of FGF8 and En1, accepted mediators of midbrain dopaminergic neuron development (Ye *et al.*, 1998; Simone *et al.*, 1998; Shamim *et al.*, 1999), were upregulated in lowered vs. 20% O<sub>2</sub> cultures. FGF8 has also been implicated in the commitment of serotonergic neurons (Ye *et al.*, 1998). These findings are consistent with a role for FGF8 in the expansion of dopaminergic and serotonergic neuronal subtypes seen in lowered O<sub>2</sub> cultures. However, addition of FGF8 to 20% O<sub>2</sub> cultures or neutralization of FGF8 in lowered O<sub>2</sub> cultures did not reproduce the O<sub>2</sub>-dependent neuronal subtype differentiation patterns. The secreted morphogen sonic hedgehog (SHH) has been shown to induce dopaminergic neuron differentiation in explants of the early neural plate (Hynes *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995). Purified sonic hedgehog had no effect on expanded mesencephalic precursors under both oxygen conditions.

Engrailed-1 mRNA and protein levels were increased in lowered oxygen. Engrailed-1 is thought to act in a pathway with pax2, wnt-1 and FGF8 to regulate the fate of midbrain neurons (Joyner, 1996; Danelian and McMahon, 1996; Wurst *et al.*, 1994; Simone *et al.*, 1998). The FGF8 gene contains a binding site for engrailed (Gernel *et al.*, 1999). In addition it was found that the FGF8 5'-UTR sequence (accession #AF065607) contains a 9 base sequence (CCTCCCTCA) that is also known to control oxygen responsiveness in VEGF and EPO regulatory elements (Scandurro, and Beckman, 1998). The inventors have not yet determined if En1 acts as a direct upstream regulator of FGF8 in lowered O<sub>2</sub> cultures, or whether they act independently. Nonetheless, the prominent expression of En1 in young neurons (FIG. 6) suggests it may be a good candidate for regulating neuronal subtype differentiation.

EPO levels are known to be regulated by oxygen in the erythropoietic system. EPO and its receptor are expressed in brain from early development through adulthood (Juul *et al.*, 1999), but no specific role for EPO in CNS development has been described. In the adult CNS, however, EPO has received attention as a neuroprotective agent (Sakanaka *et al.*, 1998), and EPO treatment of PC12 cells has been demonstrated to increase intracellular monoamine levels (Masuda *et al.*, 1993). Here the results show that at 20% O<sub>2</sub>, EPO can mimic part of the lowered O<sub>2</sub> effect. Increases in yield of dopaminergic neurons in 20% O<sub>2</sub> cultures was dose-dependent, but no additional increase in yield was mediated by EPO in lowered oxygen, suggesting that the EPO levels in lowered O<sub>2</sub> were at maximal functional levels for this response. Though EPO supplementation of 20% O<sub>2</sub> cultures significantly improves dopaminergic yield, the full effect of lowered O<sub>2</sub> could not be recapitulated, suggesting that additional factors are involved in promoting dopaminergic differentiation in lowered O<sub>2</sub>. Nonetheless, the finding that EPO affects the differentiation patterns of expanded CNS precursors is novel and identifies EPO as a component of increased dopaminergic neuron yield in lowered oxygen conditions.

A recent report highlighted increased dopamine content after differentiated dopaminergic mesencephalic neurons were exposed to hypoxic conditions (0% O<sub>2</sub> gas mixture) (Gross *et al.*, 1999). Another study described a relative increase in TH-expressing neurons in primary neuronal cultures from E14 rats after exposure to 5%



O<sub>2</sub> (Colton *et al.*, 1995). It is also known that hypoxic conditions favor expression of the TH gene (Czyzyk-Krzeska *et al.*, 1994; Paulding, and Czyzyk-Krzeska, 1999). However, this is the first report that lowered oxygen conditions support CNS stem cells during the expansion phase and enhance the production of ventral neuronal subtypes.

Compared to 20% O<sub>2</sub> the net expansion of dopaminergic neurons in lowered O<sub>2</sub> was at least 9-fold increased (a three-fold increase in total cell numbers, and a 3-fold increase in the percentage of TH<sup>+</sup>-neurons). HPLC shows that these neurons produce dopamine. The present results show that oxygen levels much lower than those traditionally used in culture may be useful in mimicking *in vivo* phenomena. Lowered O<sub>2</sub> culturing has the practical implication of contributing to a more efficient production of dopaminergic neurons for transplant therapy in Parkinson's disease. Finally, effects of lowered, more physiological O<sub>2</sub> on cell cultures are not limited to the CNS, and extend to the PNS and to other non-neuronal tissues.

-46-

The effect of EPO on dopaminergic differentiation was studied. Saturating concentrations of EPO or EPO neutralizing antibody were added to E12 mesencephalic precursor cultures during both proliferation and differentiation phase (5 days each) in lowered or 20% O<sub>2</sub> using the conditions set forth in example 3. EPO was added to medium at a dose 5 U/ml for 5 days at the time of plating (isolation) or starting at the time of bFGF withdrawal. At the end of 10 days total time in culture, cells were fixed and stained for TH to mark dopaminergic neurons. The number of positive-staining cells were counted. EPO supplementation significantly increased TH+ cell numbers in 20% O<sub>2</sub> cultures (n=6, p < 0.05).

The experiment was repeatedly with anti-EPO in place of EPO. The anti-EPO concentration was in a saturating concentration. The timing was the same as the EPO experiments, and they were stained and counted at the same 10 day time point. EPO neutralizing antibody decreased TH+ cell numbers in both lowered oxygen (n=6, p < 0.01) and 20% O<sub>2</sub> cultures (n=6, p < 0.05). Figure 8 shows the results when EPO was added early. Similar results were obtained with the late addition of EPO.

\* \* \*

All of the compositions and/or methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the compositions and/or methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

## REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

5

Bjorklund and Stenevi, Intracerebral neural grafting in animal models of aging brain: strategies, rationale and preliminary results. *Dan Med Bull.* 32 Suppl 1:35-9 (1985).

10

Bjorklund, Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery, *Curr Opin Neurobiol.* 2(5):683-9 (1992)

Bosic *et al.*, Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis, " *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:13280-13285, 1996.

15

Bowenkamp *et al.*, Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J Comp Neurol.*;355(4):479-89 (1995).

Chen and Okayama, High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA," *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, (1987)

20

Chen *et al.*, The effect of prior *in vitro* exposure of donor cells to trophic factors in neuro transplantation. *Exp. Neurol.*, 138:64-72. (1996).

Colton *et al.*, Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. *Exper. Neurol.* 132, 54-61 (1995).

25

Cornelison & Wold, "Single-Cell analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells," *Developmental Biology*, 191:270-283, (1997).

Czyzyk-Krzeska *et al.*, Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Biol. Chem.* 269, 760-764 (1994).

30

Danielian, P.S., McMahon, A.P. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 383, 332-334 (1996).

Dunnett and Bjorkland., *in* Functional Neural Transplantation, Advances in Neuroscience, Volume 2, Raven Press, New York (1994)

Echelard *et al.*, Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430, (1993).

5 Engele and Bohn, The neurotrophic effects of fibroblast growth factor on dopaminergic neurons *in vitro* are mediated by mesencephalic glia. *J. Neurosci.*, 11:3070-3078 (1991).

Ericson *et al.*, Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747-756  
10 (1995).

Fraley *et al.*, "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, (1979).

Freernan *et al.*, The USF protocol for fetal nigral transplantation in Parkinson's disease *Experimental Neurology*, 129:6-7(1994).

15 Gash *et al.*, Functional recovery in Parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380:252-255. (1996).

Gemel *et al.*, Fibroblast growth factor-8 expression is regulated by intronic engrailed and Pbx1-binding sites. *J. Biol. Chem.* 274, 6020-6026 (1999).

20 Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures," *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, (1985).

Graham and van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology*, 52:456-467, (1973).

Gritti *et al.*, Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16, 1091-1100  
25 (1996).

Gross *et al.* Hypoxia during early developmental period induces long-term changes in the dopamine content and release in a mesencephalic cell culture. *Neuroscience* 92, 699-704 (1999).

30 Gundersen *et al.*, Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 379-394 (1988).

- Guyton and Hall, "Transport of oxygen and carbon dioxide in the blood and body fluids," *In: Textbook of Medical Physiology*, WB Saunders Co., Philadelphia, 1996, pp. 513-523.
- 5 Harland and Weintraub, "Translation of mammalian mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA," *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, (1985).
- Hazel & Muller, "Culture of Neuroepithelial Stem Cells," *Current Protocols in Neuroscience*, 3.1.1-3.1.6, (1997).
- 10 Hoffinan *et al.*, "Comparison of the effect of etomidate and desflurane on brain tissue gases and pH during prolonged middle cerebral artery occlusion." *Anesthesiology* 88, 1198-1194, 1998.
- Hyman *et al.*, BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 350:230-232 (1991).
- 15 Hynes and Rosenthal, Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 26-36 (1999).
- Hynes *et al.*, Control of neuronal diversity by the floor plate: Contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* 80, 95-101 (1995).
- Isacson *et al.*, Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:2728-2732 (1986).
- 20 Johe *et al.*, Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10, 3129-3140 (1996).
- Joyner, A.L. *Engrailed*, *Wnt*, and *Pax* genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* 12, 15-20 (1996).
- 25 Juul *et al.*, Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2, 148-158 (1999).
- Kalyani *et al.*, Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci.* 18, 1856-1868 (1998).
- Kang *et al.*, Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(23):13788-13793, 1998.
- 30 Knusel *et al.*, Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast



growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.*, 10:558-567. ., (1990).

Knusel *et al.*, Promotion of cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:961-965(1991).

Kocher *et al.*, Identification of a novel gene, selectively up-regulated in human carcinomas, using the differential display technique. *Clin. Cancer Res.*, 1(10):1209-1215, (1995).

Koos and Power, Predict fetal brain PO<sub>2</sub> during hypoxaemia and anemia in sheep. *J. Develop. Physiol.* 9, 517-726 (1987).

Lendahl *et al.*, CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595 (1990).

Lindvall *et al.*, Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247:574-577(1990).

Martinez-Serrano *et al.* CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult brain: complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. *J. Neurosci.*, 15:5668-5680(1996).

Masuda *et al.*, Functional erythropoietin receptors of the cells with neural characteristics – Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 268, 11208-11216 (1993).

Max *et al.*, Co-expression of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in dopamine differentiation factor-treated striatal neurons in culture. *Dev. Brain Res.* 91, 140-142 (1996).

Maxwell *et al.*, The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275 (1999).

Mayer *et al.*, Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons-I. Effects *in vitro*. *Neuroscience*, 56:379-388 (1993a).

Mayer *et al.*, Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons-II. Effects on nigral transplants *in vivo*. *Neurosci.*, 56:389-398, (1993b).

- Mayer-Proschel *et al.*, Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 19, 773-785 (1997).
- McKay, R.D. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66-71 (1997).
- Moreau *et al.*, Regulation of c-ret expression by retinoic acid in rat metanephros: implication in nephron mass control. *Am. J. Physiol.* 44, F938-F945 (1998).
- Neelakanta & Csete, "Efforts to overcome the liver donor shortage," *Chirurgia Internat.*, 1996.
- Neural Grafting in the Mammalian CNS, Bjorklund and Stenevi, eds., 1985 Das, Ch. 3 pp. 23-30; Freed, Ch. 4, pp. 31-40; Stenevi *et al.*, Ch. 5, pp. 41-50; Brundin *et al.*, Ch. 6, pp. 51-60; David *et al.*, Ch. 7, pp. 61-70; Seiger, Ch. 8, pp. 71-77, 1985
- Nicolau and Sene, Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, (1982).
- Nikkhah *et al.*, Platelet-derived growth factor promotes survival of rat and human mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Exp. Brain Res.*, 92:516-523 (1993).
- Nurse and Vollmer, Role of basic FGF and oxygen in control of proliferation, survival, and neuronal differentiation in carotid body chromaffin cells. *Dev. Biol.* 184, 197-206 (1997).
- Olanow *et al.*, Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 19, 102-109 (1996).
- Olson, Toward trophic treatment in parkinsonism: a primate step. *Nature Med.*, 2:400-401(1996).
- O'Rourke *et al.*, "Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone," *Development* 124:997-1005, (1997).
- Othberg *et al.*, Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on embryonic rat and human DA neurons *in vitro*. *Exp. Brain Res.*, 105:111-122 (1995).
- Panchinsion *et al.*, Plasticity and stem cells in the vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 727-733 (1998).
- Paulding and Czyzyk-Krzeska, Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA stability by protein binding, pyrimidine-rich sequence in the 3'untranslated region. *J. Biol. Chem.* 274, 2532-2538 (1999).

- Perez Velazquez *et al.*, *In vitro* ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 17, 9085-9094 (1997).
- 5 Potter *et al.*, Enhancer-dependent expression of human  $\kappa$  immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation, *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Poulsen *et al.*, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. *Neuron*, 13:1245(1994).
- 10 Rippe *et al.*, DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rosenblad. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts. *Neurosci.* 75:979-985 (1996).
- 15 Rutka *et al.*, Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review *J Neurosurg.*;87(3):420-30, (1997).
- Sakanaka, *et al.* *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4635-4640 (1998).
- Sanberg *et al.*, Cell transplantation for Huntington's disease R.G. Landes Co., Boca Raton, Fla., pp. 19-21, (1994).
- 20 Saucedo-Cardenas *et al.*, Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4013-4018, (1998).
- 25 Sauer *et al.*, Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor  $\beta$ 3 prevents delayed degeneration of nigral DA neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92:8935-8939(1994).
- Scandurro and Beckman, Common proteins bind mRNAs encoding erythropoietin, tyrosine hydroxylase, and vascular endothelial growth factor. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 246, 436-440 (1998).
- 30 Schmidt *et al.*, Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [ $^{14}\text{C}$ ]2-deoxy-D-glucose autoradiography *J. Neurochem.* 38:737-748, (1982).

- Sharnim *et al.*, Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain. *Development* 126, 945-959 (1999).
- Silver and Erecinska, Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. In *Oxygen Transport to Tissue XX*, 7-15, edited by Hudetz and Bruley, Plenum Press, New York (1988).
- Simone *et al.*, En-1 and En-2 control the fate of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmentum. *Eur. J. Neurosci.* 10, 389-399 (1998).
- Smidt *et al.*, A homeodomain gene Ptx 3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 13305-13310, (1997).
- Stenevi *et al.*, Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival, *Brain Res.* 114:1-20 (1976)
- Studer *et al.*, Non-invasive dopamine determination by reversed phase HPLC in the medium of free-floating roller tube cultures of rat fetal ventral mesencephalon. A tool to assess dopaminergic tissue prior to grafting. *Brain Res. Bull.* 41, 143-150 (1996).
- Studer *et al.*, Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature Neurosci.* 1, 290-295 (1998).
- Tur-Kaspa *et al.*, Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes, *Mol. Cell Biol.* 6:716-718, 1986.
- U.S Patent 5,082,670
- U.S Patent 5650148
- U.S Patent 5762926
- U.S. Patent 4,683,195
- U.S. Patent 4,800,159
- U.S. Patent 4,861,719
- U.S. Patent 4,886,741
- U.S. Patent 4,888,278
- U.S. Patent 5,019,034
- U.S. Patent 5,120,657
- U.S. Patent 5,139,941
- U.S. Patent 5,225,326

U.S. Patent 5,252,479  
U.S. Patent 5,328,688  
U.S. Patent 5,364,790  
U.S. Patent 5,474,935  
5 U.S. Patent 5,506,098  
U.S. Patent 5,507,724  
U.S. Patent 5,521,061  
U.S. Patent 5,538,869  
U.S. Patent 5,585,362  
10 U.S. Patent 5,612,205  
U.S. Patent 5,612,205  
U.S. Patent 5,620,689  
U.S. Patent 5,622,856  
U.S. Patent 5,631,018  
15 U.S. Patent 5,658,776  
U.S. Patent 5,661,025  
U.S. Patent 5,661,033  
U.S. Patent 5,665,540  
U.S. Patent 5,670,488  
20 U.S. Patent 5,686,278  
U.S. Patent 5,693,509  
U.S. Patent 5,707,618  
U.S. Patent 5,714,166  
U.S. Patent 5,721,367  
25 U.S. Patent 5,749,847  
U.S. Patent 5,750,376  
U.S. Patent 5,770,414  
U.S. Patent 5,773,289  
U.S. Patent 5,785,987  
30 U.S. Patent 5,789,213  
U.S. Patent 5,789,215  
U.S. Patent 5,789,390

- U.S. Patent 5,795,581  
U.S. Patent 5,800,992  
U.S. Patent 5,824,544  
U.S. Patent 5,824,547  
5 U.S. Patent 5,827,703  
U.S. Patent 5,830,698  
U.S. Patent 5,830,725  
U.S. Patent 5,830,727  
U.S. Patent 5,834,181  
10 U.S. Patent 5,834,441  
U.S. Patent 5,836,905  
U.S. Patent 5,849,571  
U.S. Patent 5,851,521  
U.S. Patent 5,851,818  
15 U.S. Patent 5,855,910  
U.S. Patent 5,856,152  
U.S. Patent 5,861,314  
U.S. Patent 5,863,541  
U.S. Patent 5,869,326  
20 U.S. Patent 5,879,934  
U.S. Patent 5,888,502
- Ungerstedt and Arbuthnott, Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485-493, (1970).
- 25 Wang *et al.*, Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nature Med.* 1, 1184-1188 (1995).
- Victorin *et al.*, Reformation of long axon pathways in adult rat CNS by human forebrain neuroblasts. *Nature*, 347:556-558 (1990).
- Wu and Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells *in vitro*,"  
30 *Biochemistry*, 27:887-892, (1988).
- Wu and Wu, Receptor-mediated *in vitro* gene transfections by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, (1987).



Wurst *et al.*, Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: An early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum.

*Development* 120, 2065-2075 (1994).

5 Yamada *et al.*, Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647, (1991).

Yang *et al.*, "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990.

Ye *et al.*, FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755-766 (1998).

10 Yoshimoto *et al.*, Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, 691:25-36, (1995).

## CLAIMS

1. A method of increasing cell differentiation comprising culturing undifferentiated central nervous system (CNS) cells in low ambient oxygen conditions, wherein said low ambient oxygen conditions promotes the cellular differentiation of said neuronal cells.
2. The method of claim 1, wherein said low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 0.25% to about 18% oxygen.
3. The method of claim 1, wherein said low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 0.5% to about 15% oxygen.
4. The method of claim 1, wherein said low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 1% to about 10% oxygen.
5. The method of claim 1, wherein said low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 1.5% to about 6% oxygen.
6. The method of claim 1, wherein said low ambient oxygen conditions mimic physiological oxygen conditions for CNS cells.
7. The method of claim 1, wherein said cells are primary tissue culture cells.
8. The method of claim 1, wherein said cells are derived from a cell line.
9. The method of claim 1, wherein said cells are selected from the group consisting of a central nervous system stem cells, spinal cord-derived progenitor cells, glial cells, astrocytes, neuronal stem cells, central nervous system neural crest-derived cells, neuronal precursor cells, neuronal cells, hepatocytes, and bone marrow derived cells.

10. The method of claim 9, wherein said cells are fetal cells.
11. The method of claim 9, wherein said cells are adult cells.
- 5 12. The method of claim 1, wherein said cells are selected from the group consisting of mesencephalic progenitor cells, lateral ganglionic precursor cells, cortical precursor cells, astrocytes and neuroblasts.
- 10 13. The method of claim 1, wherein said differentiation is determined by monitoring a differentiation specific phenotype in said cells.
14. The method of claim 13, wherein said differentiation specific phenotype determined by monitoring message level, protein level, subcellular localization, functional assays or morphological changes.
- 15 15. The method of claim 14, wherein said message level is monitored using PCR<sup>TM</sup>, in situ hybridization, RNase protection assay, or single cell PCR<sup>TM</sup>.
- 20 16. The method of claim 14, wherein said protein level is monitored using antibody staining, HPLC, western blotting or immunoprecipitation.
- 25 17. The method of claim 14 wherein said message level monitored is the message for nestin, tyrosine hydroxylase, GAPDH; BDNF; GDNF; FGFR3; En1; FGF8; SHH; Ptx3; Nurr1; VEGF; EPO; HIF1 $\alpha$  or VHL.
18. The method of claim 15 wherein said protein level monitored is the level of nestin, tyrosine hydroxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase or dopamine transporter.
- 30 19. The method of claim 14, wherein said functional assay monitors the rate of dopamine production.

20. The method of claim 1, wherein said low oxygen conditions produce a cell population that is enriched in dopaminergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions.
- 5 21. The method of claim 1, wherein said low oxygen conditions produce a cell population that is enriched in serotonergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions.
- 10 22. The method of claim 1, wherein said low oxygen conditions produce a cell population that is depleted in GABAergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions.
- 15 23. The method of claim 1, wherein said low oxygen conditions produce a cell population that is depleted in glutaminergic neurons as compared to a similar cell population that is grown in 20% oxygen incubator conditions.
- 20 24. The method of claim 1, further comprising growing said cells in the presence of a neuronal growth stimulant, mitogen, cytokine, neuroprotective factor or an anti-apoptotic agent.
- 25 25. The method of claim 1, wherein said differentiated phenotype is retained after transfer of said cells from said low ambient oxygen conditions to 20% oxygen culture conditions.
- 26 26. The method of claim 25, wherein said cells are grown in low ambient oxygen conditions for multiple generations prior to transfer to 20% oxygen culture conditions.
- 30 27. The method of claim 1, wherein said cells are continuously maintained in low ambient oxygen conditions.

28. A method of inhibiting apoptosis of a CNS cell in culture comprising growing said cell in low ambient oxygen conditions.
- 5 29. The method of claim 28, wherein said low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 0.25% to about 18% oxygen.
- 10 30. A method of increasing the expansion of a CNS cell in culture comprising growing said cell in low ambient oxygen, wherein said cell exhibit increased expansion in said low ambient oxygen as compared to growing said cell in 20% oxygen incubator conditions.
- 15 31. The method of claim 30, wherein said low ambient oxygen conditions comprise an ambient oxygen condition of between about 0.25% to about 18% oxygen.
- 20 32. The method of claim 30, wherein said low ambient oxygen conditions mimic physiological oxygen conditions for CNS cells.
33. The method of claim 30, wherein said cell is a primary tissue culture cell.
34. The method of claim 30, wherein said cell is derived from a cell line.
- 25 35. The method of claim 30, wherein said cell is a fetal cell.
36. The method of claim 30, wherein said cell is an adult cell.
- 30 37. A method of increasing cell proliferation in culture comprising growing CNS cells in low ambient oxygen, wherein said growth in low ambient oxygen increases cell proliferation compared to growing said cells in 20% oxygen incubator conditions.

38. A method of preparing a cell for use against a neurodegenerative disorder comprising
- a) obtaining a population of CNS cells and
  - b) growing said cells in low ambient oxygen conditions
- 5 wherein said low ambient oxygen conditions increases the expression of a gene involved in said neurodegenerative disease.
39. The method of claim 38, wherein said neurodegenerative disease is Parkinson's Disease.
- 10 40. The method of claim 38 wherein said gene is tyrosine hydroxylase (TH).
41. The method of claim 38, wherein said cell is a primary cell.
- 15 42. The method of claim 38, wherein said cell is derived from a cell line.
43. The method of claim 38, further comprising contacting said cell with a first polynucleotide encoding a dopamine biosynthetic protein under conditions suitable for the expression of said protein wherein said polynucleotide is under
- 20 the transcriptional control of a promoter active in said cells.
44. The method of claim 38, further comprising contacting said cell with a first polynucleotide encoding a dopamine releasing protein under conditions suitable for the expression of said protein wherein said polynucleotide is under
- 25 the transcriptional control of a promoter active in said cells.
45. The method of claim 43, further comprising contacting said cell with a second polynucleotide encoding a dopamine releasing protein under conditions suitable for the expression of said protein wherein said polynucleotide is under
- 30 the transcriptional control of a promoter active in said cells.



- 5
46. The method of claim 44, further comprising contacting said cell with a second polynucleotide encoding a dopamine biosynthetic protein under conditions suitable for the expression of said protein wherein said polynucleotide is under the transcriptional control of a promoter active in said cells.
- 10
47. The method of claim 43, wherein said dopamine biosynthesis protein is selected from the group consisting of TH; L-amino acid decarboxylase (AADC) and erythropoietin.
- 15
48. The method of claim 44, wherein said dopamine releasing protein is a vesicular monoamine transporter (VMAT).
- 20
49. The method of claim 45, wherein said first and second polynucleotides are under control of different promoters.
50. The method of claim 46, wherein said first and second polynucleotides are under control of different promoters.
- 25
51. The method of claim 43, wherein the promoter is selected from the group consisting of CMV IE, SV40 IE,  $\beta$ -actin, TH promoter, AADC promoter, and nestin promoter.
- 30
52. The method of claim 45, wherein said first and second polynucleotides each are covalently linked to a polyadenylation signal.
53. The method of claim 46, wherein said first and second polynucleotides each are covalently linked to a polyadenylation signal.
54. A cell produced according to the method comprising obtaining a starting CNS cell and growing said cell in low ambient oxygen conditions wherein said conditions produce a differentiated neuronal cell.

55. The cell of claim 54, wherein said starting cell is a nestin-positive cell.
56. The cell of claim 54, wherein said low ambient conditions produce a nestin-negative cell.
57. The cell of claim 54, wherein said low ambient conditions produce a TH positive cell.
58. The cell of claim 54, wherein said cell further comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding an exogenous gene wherein said polynucleotide is operatively linked to a promoter.
59. A method of treating Parkinson's disease in a subject comprising:
- a) obtaining cells suitable for transplanting to said subject;
  - b) growing said cells in low ambient oxygen conditions; and
  - c) implanting said cells grown from step (b) into said subject
- wherein said implanted cells have an increased capacity to produce dopamine in said subject as compared to similar cells grown in 20% oxygen incubator conditions.
60. The method of claim 59, wherein said cells are from said subject and have been transduced with a polynucleotide that expresses a protein that increases dopamine production.
61. The method of claim 59, wherein said cells are CNS cells from a source other than said subject.
62. The method of claim 59, wherein said cells are transduced with a polynucleotide that expresses a protein that increases dopamine production.

## SEQUENCE LISTING

5       <110> Csete, Marie  
          Doyle, John  
          Wold, Barbara J.  
          McKay, Ron  
          Studer, Lorenz

10       <120> Low Oxygen Culturing of Central Nervous System  
          Progenitor Cells

          <130> 8597-18

15       <140> unknown  
          <141> 1999-11-18

          <150> 09/195,569  
          <151> 1998-11-18

20       <160> 24

          <170> PatentIn Ver. 2.0

25       <210> 1  
          <211> 26  
          <212> DNA  
          <213> Artificial Sequence

30       <220>  
          <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
                  primer for GAPDH

35       <400> 1  
          ctcgtctcat agacaagatg gtgaag 26

          <210> 2  
          <211> 24  
          <212> DNA  
          <213> Artificial Sequence

40       <220>  
          <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
                  primer for GAPDH

45       <400> 2  
          agactccacg acatactcag cacc 24

50       <210> 3  
          <211> 24  
          <212> DNA  
          <213> Artificial Sequence

55       <220>  
          <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
                  primer for VHL

          <400> 3  
          cctctcaggt catcttctgc aacc 24

5       <210> 4  
      <211> 21  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence

10       <220>  
      <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
          primer for VHL

      <400> 4  
      agggatggca caaacagttc c 21

15       <210> 5  
      <211> 24  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence

20       <220>  
      <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
          primer for HIF1a

25       <400> 5  
      gcagcacgat ctcggcgaag caaa 24

30       <210> 6  
      <211> 24  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence

35       <220>  
      <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
          primer for HIF1a

      <400> 6  
      gcaccataac aaagccatcc aggg 24

40       <210> 7  
      <211> 21  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence

45       <220>  
      <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
          primer for EPO

50       <400> 7  
      cgctccccca cgcctcattt g 21

55       <210> 8  
      <211> 22  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence

      <220>  
      <223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
          primer for EPO

<400> 8  
agcggccttgg gtggcgtctg ga 22

5 <210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

10 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
primer for VEGF

15 <400> 9  
gtgcactgga ccctggcttt act 23

20 <210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
primer for VEGF

25 <400> 10  
cgccttgcaa cgcgagtctg tggt 24

30 <210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

35 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
primer for Nurrl

40 <400> 11  
tgaagagagc ggagaaggag atc 23

45 <210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
primer for Nurrl

55 <400> 12  
tctggagtta agaaatcgga gctg 24

<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR

primer for Ptx3

<400> 13

cgtgcgtggt tggttcaaga ac

22

<:210> 14

&lt;:211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for Ptx3H

<400> 14

gcggtgagaa tacaggttgt gaag

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for SHH

<400> 15

ggaagatcac aagaaactcc gaac

24

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR primer for SHH

<400> 16

ggatgcgagc tttggattca tag

23

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR primer for FGF8

<400> 17

catgtgaggg accagagcc

19

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
primer for FGF8

5 <400> 18  
gtagttgttc tccagcagga tc 22

<210> 19  
<211> 23  
10 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
15 primer for En1

<400> 19  
tcaagactga ctacagcaac ccc 23

20 <210> 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
primer for En1

30 <400> 20  
ctttgtcctg aaccgtggtg gtag 24

<210> 21  
<211> 22  
35 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
40 primer for FGFR3

<400> 21  
atcctcggga gatgacgaag ac 22

45 <210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
primer for FGFR3

55 <400> 22  
ggatgctgcc aaacttggtc tc 22

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Description of Artificial Sequence:Forward PCR  
primer for BDNF

<400> 23

gtgacagtat tagcgagtgg g

21

10

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse PCR  
primer for BDNF

20

<400> 24

gggtagttcg gcattgc

17

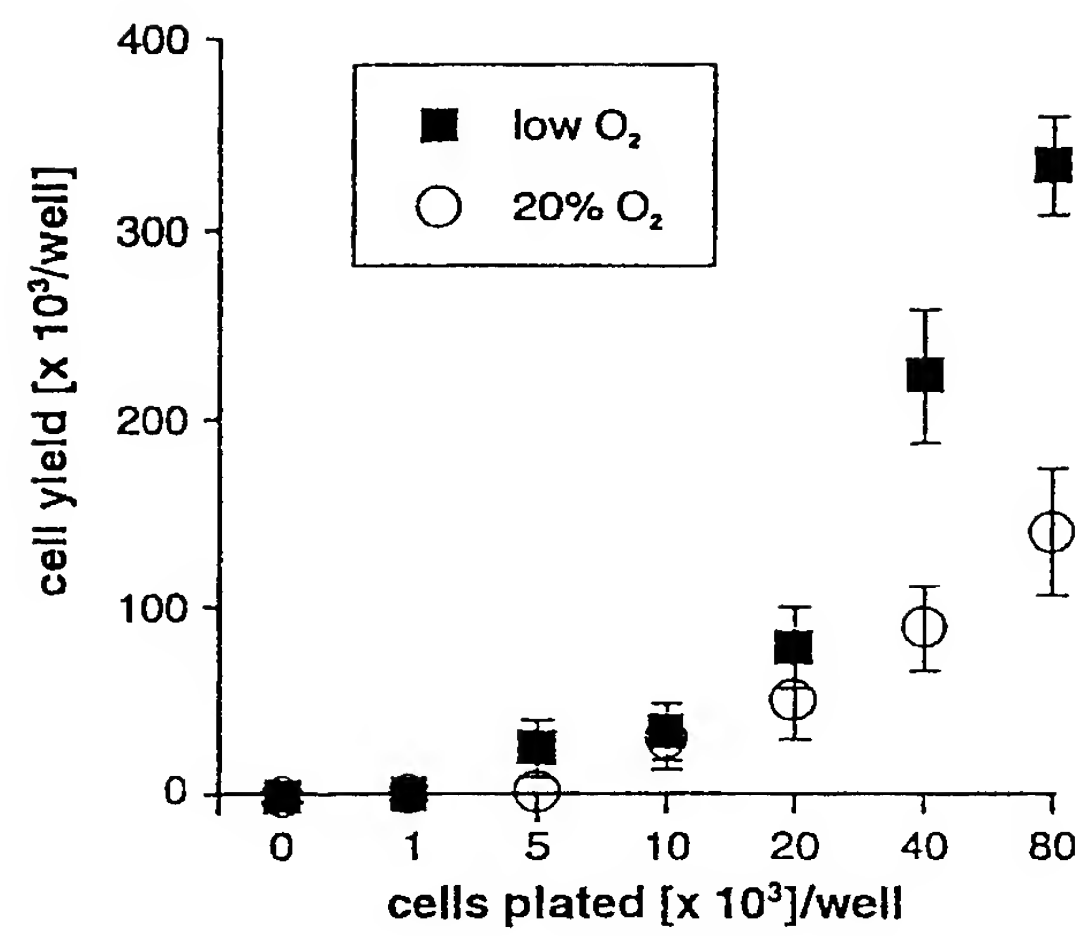


FIG. 1

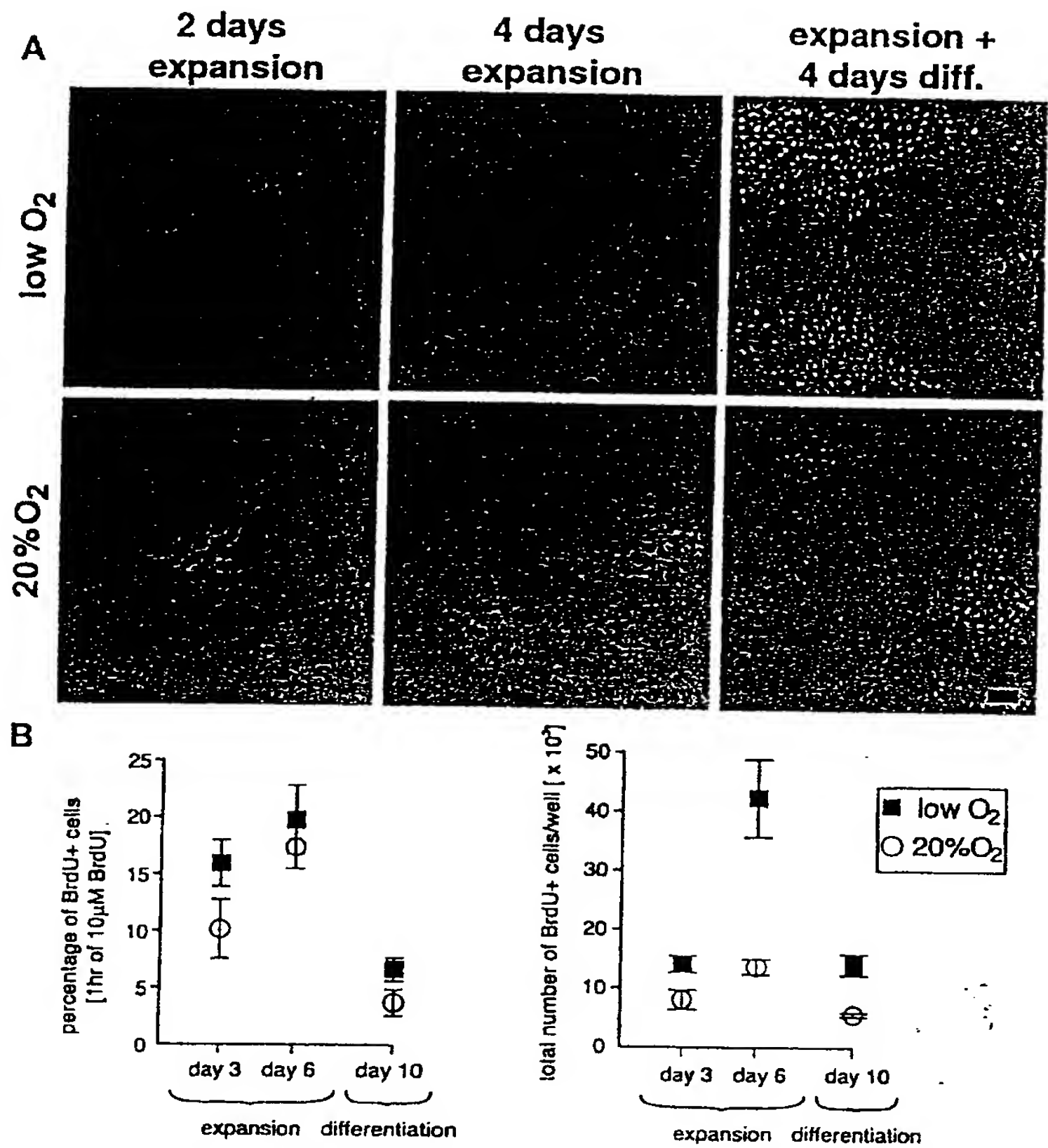


FIG. 2

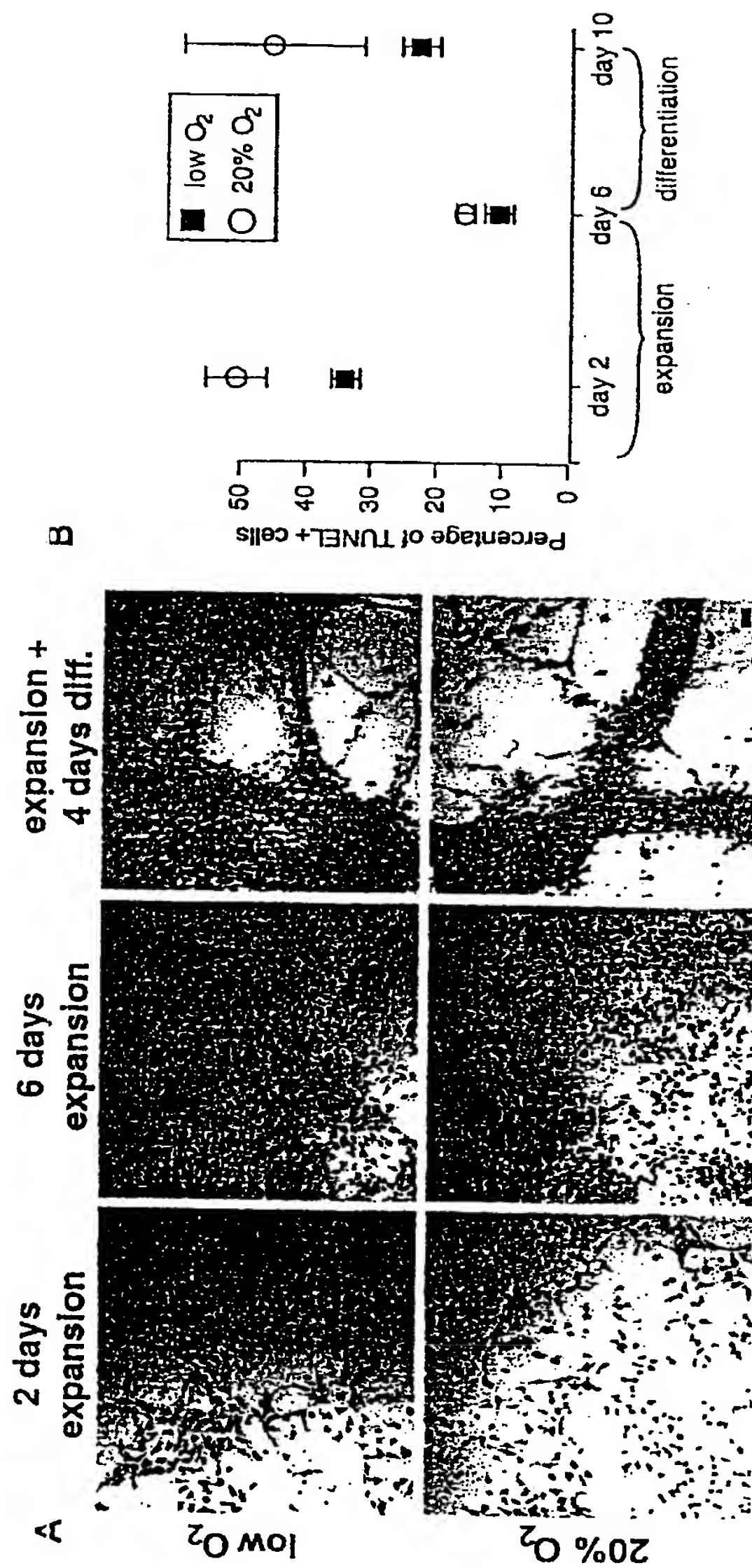


Fig 3

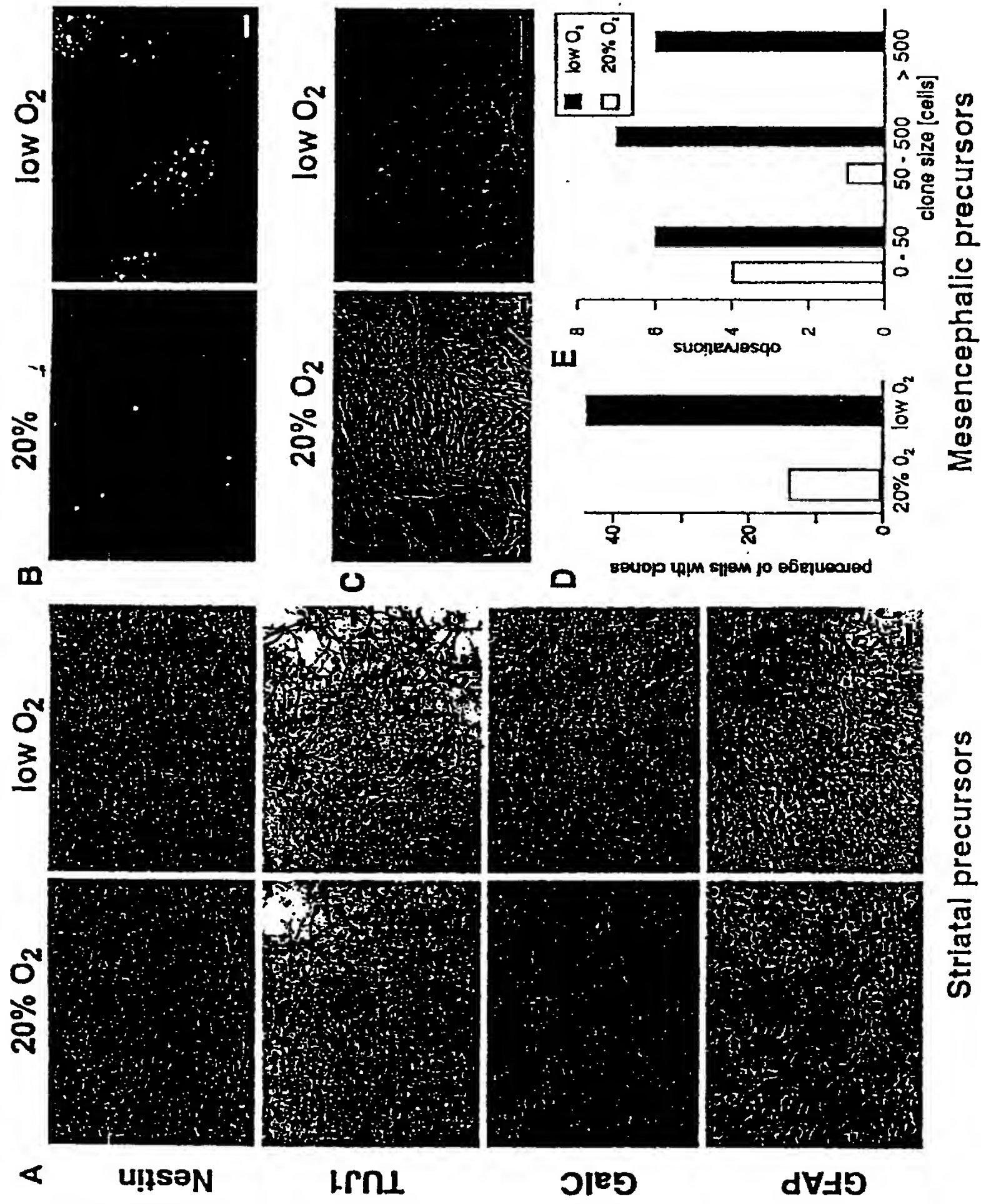


Fig 4

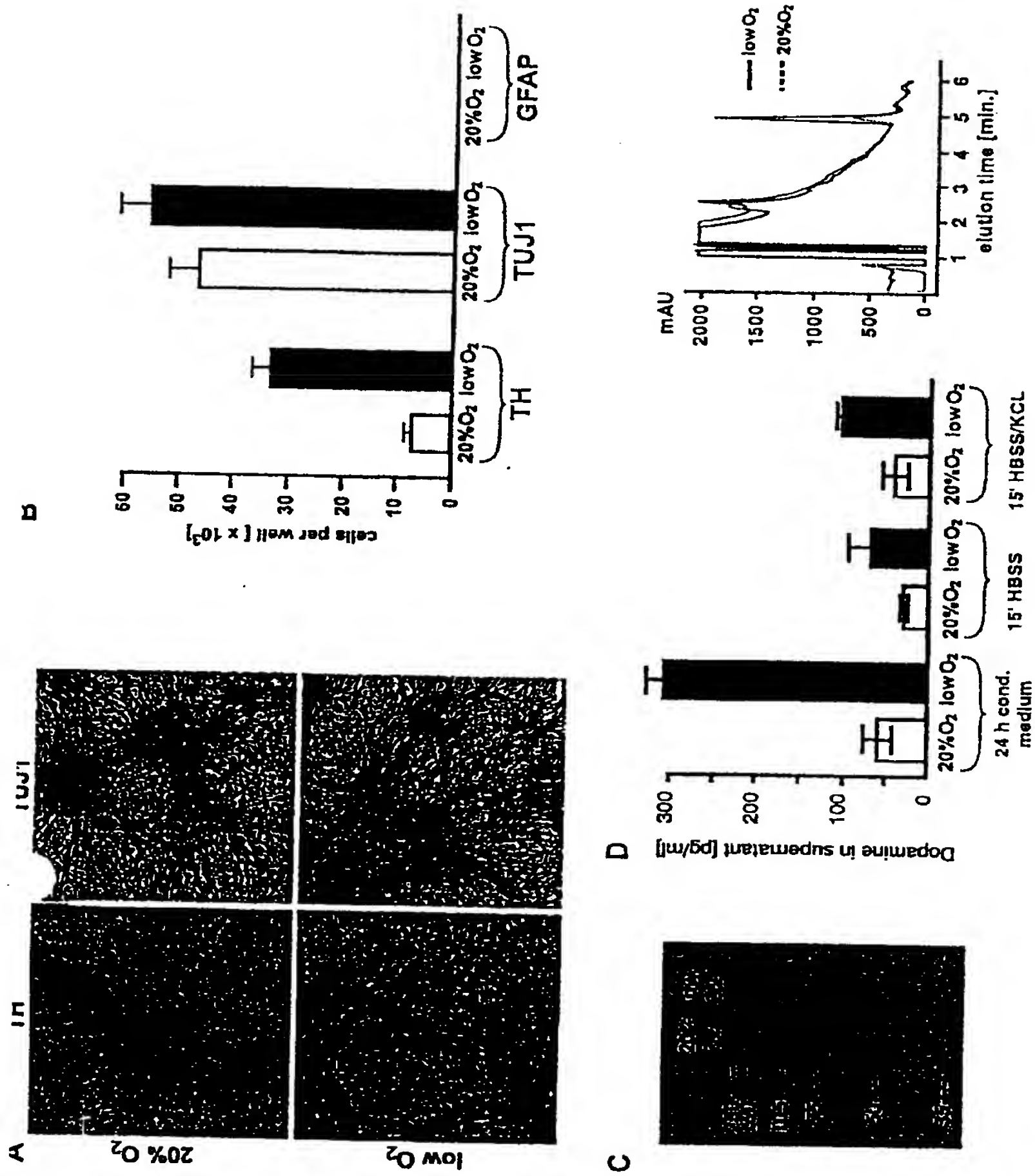


Fig 5

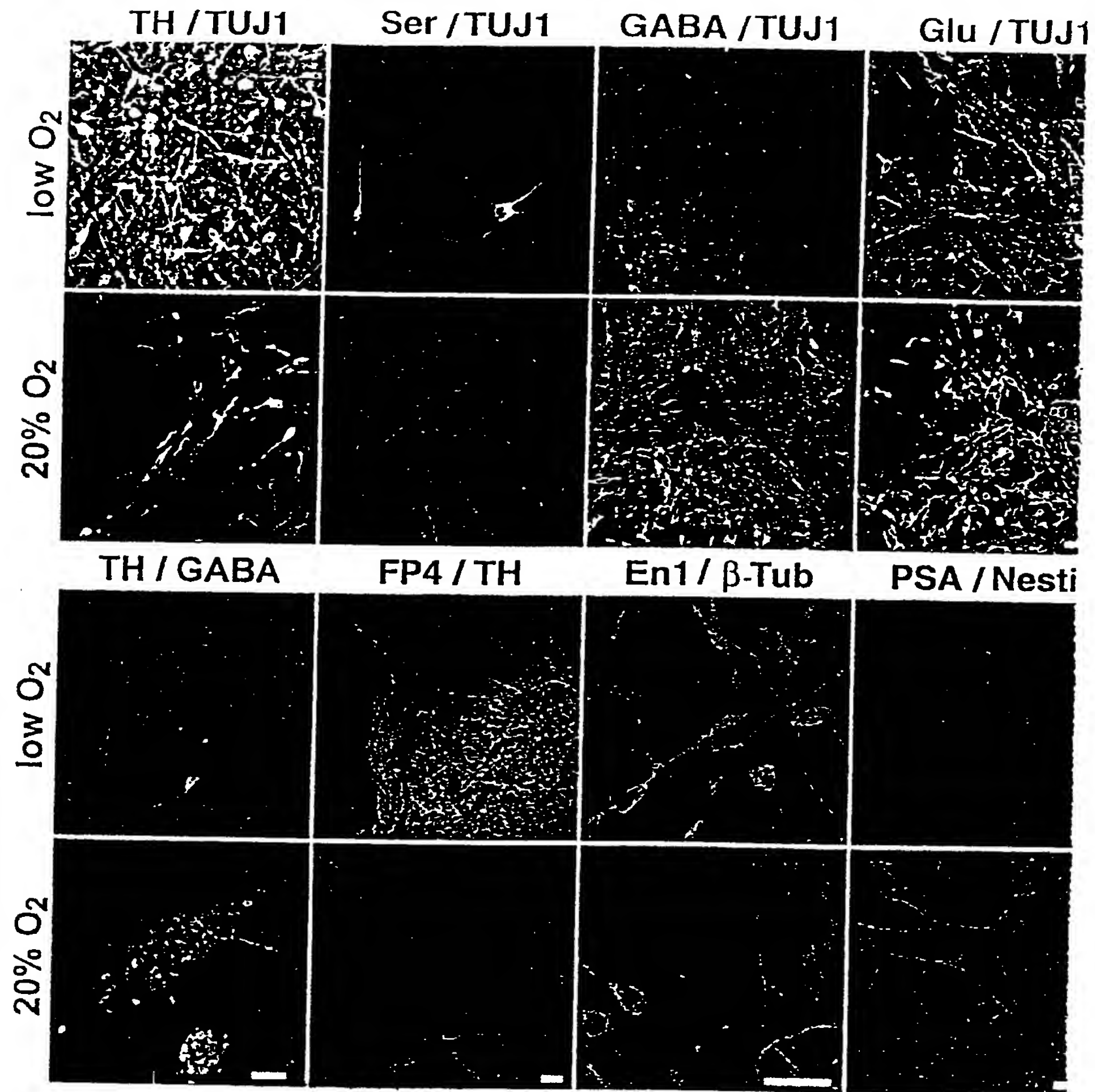


FIG. 6



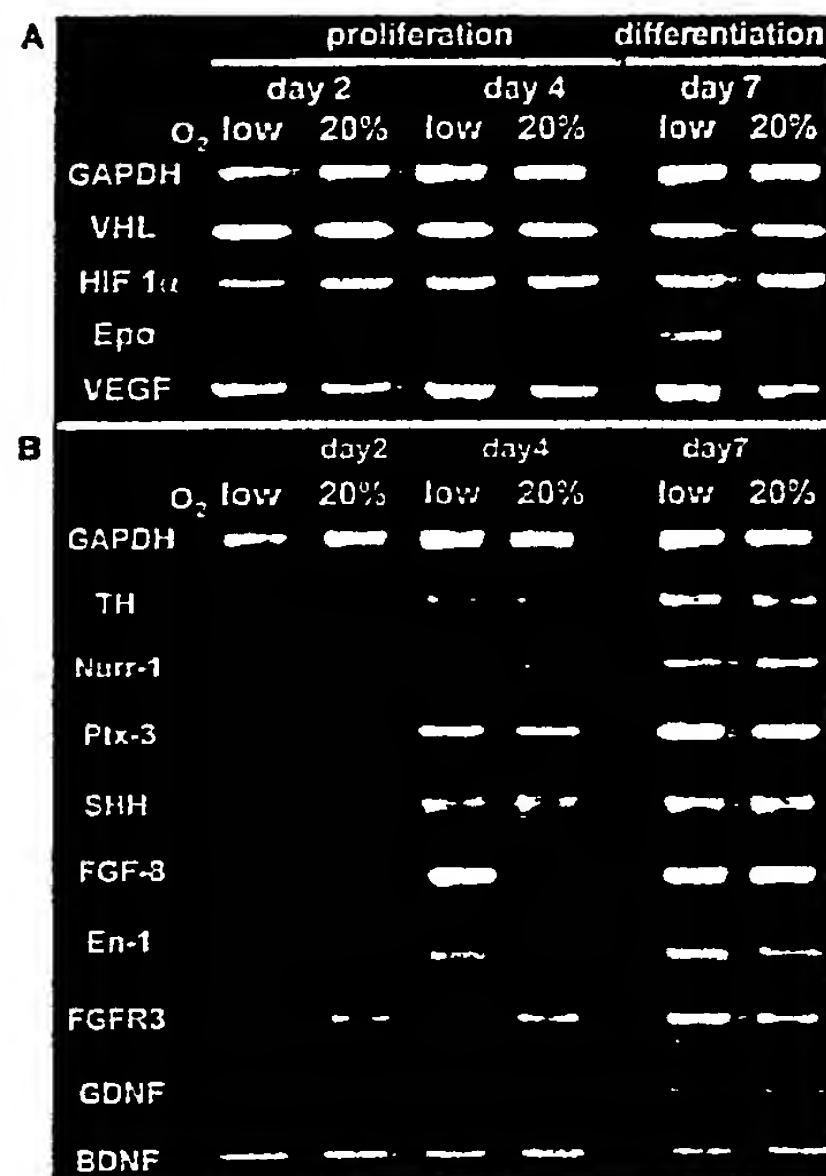


FIG. 7

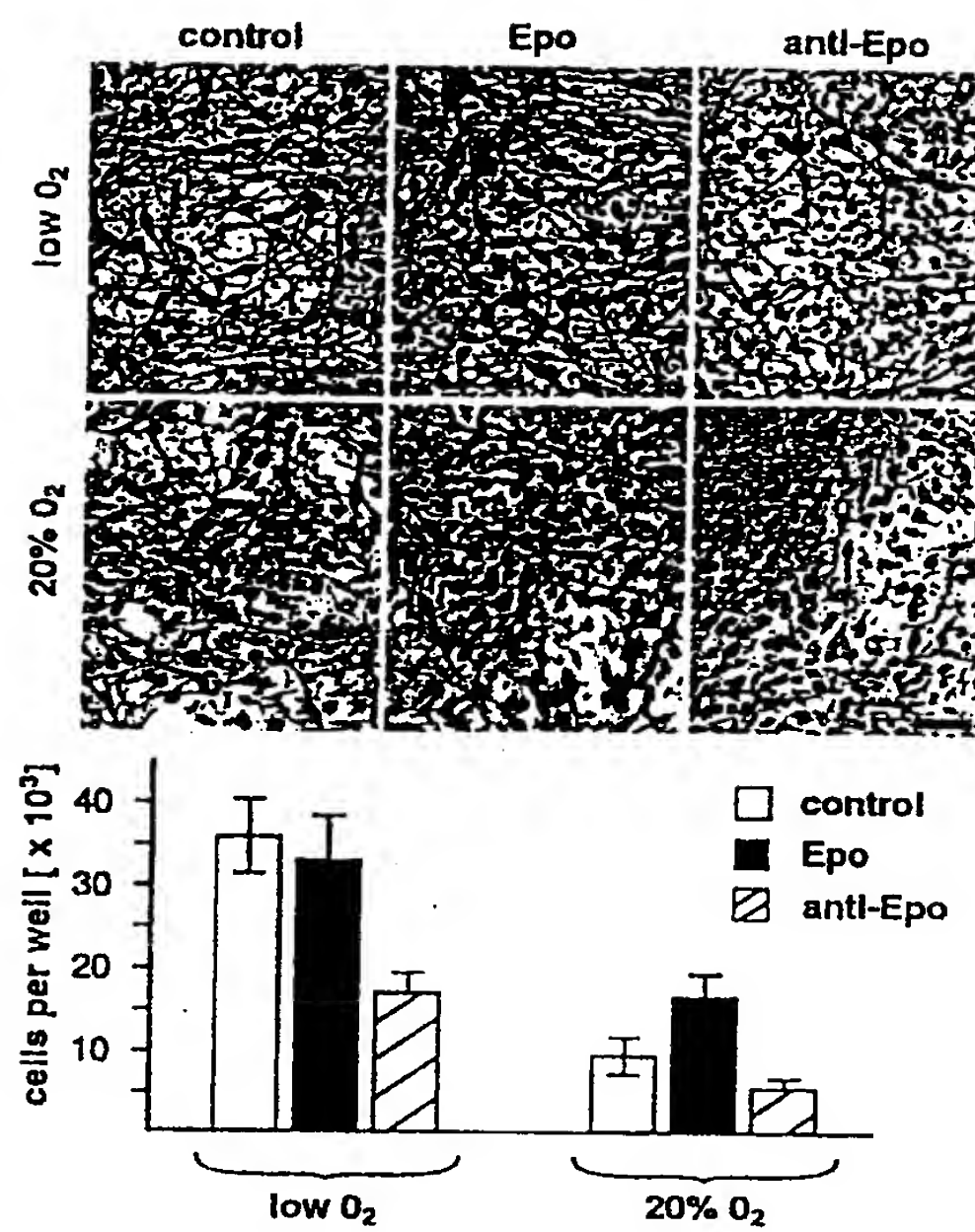


FIG. 8